

ADRIANA PEREIRA DE MATOS

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOLOGIA E DA CULTURA QUANTITATIVA
BACTERIANA DE AMOSTRAS DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA**

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de mestre em
Ciências Farmacêuticas do Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Dra. Libera Maria Dalla Costa

CURITIBA

2005

Matos, Adriana Pereira de

Avaliação da microbiologia e da cultura quantitativa bacteriana de amostras de pacientes com fibrose cística / Adriana Pereira de Matos. – Curitiba, 2005.

Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná

TERMO DE APROVAÇÃO

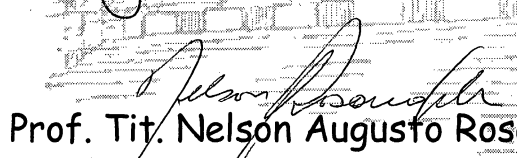
ADRIANA PEREIRA MATOS

Título: "Avaliação da microbiologia e da cultura quantitativa das amostras de pacientes com fibrose cística"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, área de concentração Análises clínicas.


Dra. Libera Maria Dalla Costa
Orientadora


Prof. Dr. Afonso Luis Barth
Universidade Federal do Rio Grande do Sul


Prof. Tit. Nelson Augusto Rosário Filho
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 28 de fevereiro de 2005

Dedico este trabalho aos meus pais que tanto fizeram por mim nessa nossa jornada que hoje se concretiza.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Fatima, guerreira, que sempre me deu força e coragem para atravessar todos os obstáculos e esteve comigo fosse apoiando ou dando conselhos que valeram e continuam valendo muito. Obrigada por todo o apoio.

Ao meu pai, Newton, que com força, simpatia e dedicação atravessou conosco todas as dificuldades e me deu a oportunidade de chegar aonde cheguei.

Ao meu noivo, Ubaldo, que apesar das horas de lazer e diversão deixadas de lado esteve comigo o tempo todo.

Ao meu irmão, Junior, que além das diferenças, fez parte da nossa rotina durante todo esse período. Sempre penso em você.

Aos meus tios Ernani e Carlinhos, tias Olga e Rita e à matriarca da família, minha avó Sara, que com muito carinho sempre me apoiaram e eu sei que estão muito felizes nesse momento.

À Dra. Libera, minha orientadora que passou por todos os desafios e me ajudou com muita dedicação e sabedoria a estar aqui.

Aos colegas do setor de Bacteriologia do Hospital de Clínicas da UFPR que estiveram sempre presentes na parte prática e foram essenciais para que o trabalho fosse concretizado, principalmente me recebendo muito bem durante os anos de convívio.

Às estagiárias do PETI, Rosana e Marinei, e à Ana Vitória, fisioterapeuta da Associação Paranaense de Fibrose Cística, que foram trabalharam com muita dedicação durante o período do estudo.

Ao auxílio financeiro da “United Medical”; do Núcleo de Estudos de Bacteriologia de Curitiba (NEBaC); do Hospital de Clínicas, através do setor de Bacteriologia e do ambulatório de Fibrose Cística; da Associação Paranaense de Fibrose Cística que disponibilizou a fisioterapeuta para realização das coletas.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ix
LISTA DE SIGLAS E LISTA DE SÍMBOLOS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO GERAL	5
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
3 REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1 HISTÓRICO DO ESTUDO.....	6
3.2 DIAGNÓSTICO.....	9
3.3 REGULADOR TRANSMEMBRÂNICO DA FIBROSE CÍSTICA (CFTR).....	12
3.4 MICROBIOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA.....	14
3.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
3.4.1.1 Epidemiologia e impacto clínico.....	16
3.4.1.2 Fatores de virulência.....	17
3.4.1.3 Transmissão.....	17
3.4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
3.4.2.1 Epidemiologia e impacto clínico.....	19
3.4.2.2 Fenótipo mucóide.....	20
3.4.2.3 Fatores de virulência.....	21
3.4.2.4 Resposta imune.....	21
3.4.2.5 Transmissão e vias de aquisição.....	23
3.4.3 Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	24
3.4.3.1 Epidemiologia e impacto clínico.....	25
3.4.3.2 Fatores de virulência.....	26
3.4.3.3 Transmissão e vias de aquisição.....	26
3.4.4 <i>Haemophilus influenzae</i>	27
3.4.4.1 Impacto clínico.....	27
3.4.4.2 Vias de aquisição.....	28
3.4.5 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	28
3.4.6 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> e <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	28
3.4.6.1 Epidemiologia e impacto clínico.....	29
3.4.6.2 Transmissão.....	29
3.4.7 Micobactérias.....	30
3.4.7.1 Impacto clínico e cultivo.....	30
3.4.7.2 Transmissão.....	31

3.4.8 Fungos.....	32
3.4.8.1 Impacto clínico.....	32
3.4.8.2 Transmissão.....	33
3.5 CULTURA E QUANTIFICAÇÃO.....	33
3.6 SOROLOGIA PARA PSEUDOMONAS.....	34
3.7 TRATAMENTO.....	35
3.7.1 Antibioticoterapia.....	36
3.7.2 Terapia de reposição enzimática.....	38
3.7.3 Fisioterapia.....	38
3.8 COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO PULMONAR.....	38
3.9 FUNÇÃO PULMONAR.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 AMOSTRAS.....	41
4.2 COLETA.....	41
4.3 TRANSPORTE.....	41
4.4 PERIODICIDADE DE COLETAS.....	42
4.5 CULTURA QUANTITATIVA.....	42
4.6 ARMAZENAMENTO DE MICRORGANISMOS.....	44
4.7 PESQUISA DE MICOBACTÉRIAS.....	44
4.7.1 Método de Petroff.....	44
4.7.2 Método do Ditiotreitol (DTT) com NaOH e Ácido Oxálico.....	45
4.8 PESQUISA DE FUNGOS.....	46
4.9 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA PRELIMINAR.....	47
4.10 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.....	48
4.10.1 Caracterização fenotípica das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
4.10.2 Caracterização fenotípica das amostras do Complexo <i>B. cepacia</i>	49
4.10.3 Identificação das amostras de <i>Staphylococcus aureus</i>	50
4.11 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS.....	51
4.12 TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	51
4.12.1 Variações das concentrações testadas.....	52
4.12.2 Potência do antibiótico.....	53
4.12.3 Concentração das soluções estoque.....	54
4.12.4 Diluições seriadas.....	54
4.12.5 Preparo das placas.....	54
4.12.6 Inoculação, incubação e leitura das placas.....	55
4.13 COLORAÇÃO DE GRAM.....	56
4.14 COLETA DE DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES.....	57
4.15 CONTAGEM DE COLÔNIAS E EXACERBAÇÃO PULMONAR.....	58

5 RESULTADOS	60
5.1 DADOS DOS PACIENTES	62
5.2 MICRORGANISMOS ISOLADOS	63
5.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA	65
5.3.1 Caracterização fenotípica das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	65
5.3.2 Caracterização fenotípica das amostras do Complexo <i>B. cepacia</i>	66
5.3.3 Identificação das amostras de <i>S. aureus</i>	66
5.4 SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS	67
5.4.1 Teste de disco-difusão de Kirby-Bauer	67
5.4.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	69
5.4.2.1 Resultados de CIM para <i>P. aeruginosa</i> mucóide e não-mucóide	69
5.4.2.2 Resultados de CIM para <i>S. aureus</i>	72
5.5 AVALIAÇÃO DA COLORAÇÃO DE GRAM	74
5.6 DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES	75
5.7 USO DE ANTIBIÓTICOS	76
5.8 CONTAGEM DE COLÔNIAS	77
5.9 CONTAGEM DE COLÔNIAS E EXACERBAÇÃO PULMONAR	77
5.9.1 Exacerbação X contagem de colônias no total de bactérias isoladas	77
5.9.2 Exacerbação X contagem de colônias para o total de <i>P. aeruginosa</i>	79
5.9.3 Exacerbação X contagem de colônias para o total de <i>S. aureus</i>	79
6 DISCUSSÃO	81
7 CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS	92
APÊNDICES	99
ANEXOS	108

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - VARIANTES GENÔMICAS E DESIGNAÇÃO DA ESPÉCIE DO COMPLEXO <i>B. cepacia</i>	24
TABELA 2 - TESTES UTILIZADOS PARA CONFIRMAÇÃO DE IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DAS AMOSTRAS DE <i>P. aeruginosa</i>	48
TABELA 3 - TESTES UTILIZADOS PARA CONFIRMAÇÃO DE IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DAS AMOSTRAS DO COMPLEXO <i>B. cepacia</i>	50
TABELA 4 - ANTIBIÓTICOS TESTADOS E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA TESTE DE CIM EM CEPAS DE <i>P. aeruginosa</i>	54
TABELA 5 - ANTIBIÓTICOS TESTADOS E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA TESTE DE CIM EM CEPAS DE <i>S. aureus</i>	54
TABELA 6 - AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE DAS AMOSTRAS PELA COLORAÇÃO DE GRAM E PARÂMETROS UTILIZADOS PARA ANÁLISE.....	58
TABELA 7 - FREQUÊNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS EM AMOSTRAS DOS PACIENTES COM FC NO PERÍODO DE 14 MESES.....	64
TABELA 8 - CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DOS 83 ISOLADOS DE <i>P. aeruginosa</i>	66
TABELA 9 - CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DOS 9 ISOLADOS CLÍNICOS DE BACTÉRIAS DO COMPLEXO <i>Burkholderia cepacia</i>	67
TABELA 10 - PORCENTAGEM DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS POR DISCO-DIFUSÃO EM 40 ISOLADOS DE <i>P. aeruginosa</i> MUCÓIDE.....	68
TABELA 11 - PORCENTAGEM DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS POR DISCO-DIFUSÃO EM 45 ISOLADOS DE <i>P. aeruginosa</i> NÃO-MUCÓIDE.....	69
TABELA 12 - PORCENTAGEM DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS POR DISCO-DIFUSÃO EM 81 ISOLADOS DE <i>S. aureus</i>	69
TABELA 13 - CIM ₅₀ , CIM ₉₀ E PORCENTAGEM DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS POR DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA 38 ISOLADOS DE <i>P. aeruginosa</i> MUCÓIDE.....	71
TABELA 14 - CIM ₅₀ , CIM ₉₀ E PORCENTAGEM DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS POR DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA 50 ISOLADOS DE <i>P. aeruginosa</i> NÃO-MUCÓIDE.....	72
TABELA 15 - PORCENTAGEM DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS POR DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA 88 ISOLADOS DE <i>P. aeruginosa</i>	73

TABELA 16 - CIM ₅₀ , CIM ₉₀ E PORCENTAGEM DE SENSIBILIDADE A ANITIBIÓTICOS POR DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA 68 ISOLADOS DE <i>S. aureus</i>	74
TABELA 17 - SINAIS E SINTOMAS DE EXACERBAÇÃO PULMONAR DOS 38 PACIENTES COM FC E SUAS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS.....	76
TABELA 18 - FREQUÊNCIA E PORCENTAGEM DOS ESCORES DOS PACIENTES COM CULTURA QUANTITATIVA DE ESCARRO.....	77

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	- DESENHO ESQUEMÁTICO DO CANAL DE CLORETO.....	12
FIGURA 2	- DIAGRAMA DA TÉCNICA DE CULTURA QUANTITATIVA PARA GERMES FACULTATIVOS.....	43
FIGURA 3	- DIAGRAMA DA TÉCNICA DE CULTURA PARA FUNGOS E MICOBACTÉRIAS.....	47
FIGURA 4	- DIAGRAMA REPRESENTATIVO DOS ISOLADOS CLÍNICOS ANALISADOS.....	62
GRÁFICO 1	- DISTRIBUIÇÃO DA IDADE DOS 38 PACIENTES POR SEXO.....	63
GRÁFICO 2	- DISTRIBUIÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS NAS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS.....	65
FIGURA 5	- CIM DE <i>P. aeruginosa</i> NAS DILUIÇÕES DE 1, 2 E 4 µg/ml DE AMICACINA RESPECTIVAMENTE.....	73
FIGURA 6	- CIM PARA <i>S. aureus</i> NA DILUIÇÃO DE 16 µg/ml DE OXACILINA.....	75
GRÁFICO 3	- EXACEBAÇÃO E CONTAGEM DE COLÔNIAS NO TOTAL DE 163 BACTÉRIAS ISOLADAS.....	79
GRÁFICO 4	- EXACERBAÇÃO E CONTAGEM DE COLÔNIAS NO TOTAL DE 93 AMOSTRAS DE <i>P. aeruginosa</i>	80
GRÁFICO 5	- EXACERBAÇÃO E CONTAGEM DE COLÔNIAS NO TOTAL DE 46 AMOSTRAS DE <i>S. aureus</i>	81

LISTA DE SIGLAS

ABA	- Aspergilose Broncopulmonar Alérgica
AC	- Ágar Chocolate
AS	- Ágar Sangue
ATCC	- American Type Culture Collection
ATP	- Adenosina Tri Fosfato
BCSA	- <i>Burkholderia cepacia</i> Selective Agar
BHI	- Brain Heart Infusion
CCC	- Célula Colunar Ciliada
CEE	- Célula Epitelial Escamosa
CFTR	- Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CQ	- Cultura Quantitativa
DTT	- Ditionitrito
FC	- Fibrose Cística
HC	- Hospital de Clínicas
MC	- Ágar Mac Conkey
MEP	- Mucoid exopolysaccharide
MRSA	- Methicilin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSA	- Ágar Manitol Salgado
MSSA	- Methicilin-Susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>
NCCLS	- National Committee for Clinical Laboratory Standards
ORCC	- Outwardly Rectifying Chloride Channel
PBS	- Phosphate Buffer Solution
PMN	- Polimorfonucleares
RX	- Raio X
TIR	- Tripsina Imuno Reagente
UFC	- Unidades Formadoras de Colônias
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
VEF1	- Volume Expiratório Forçado por 1 segundo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	- Por cento
Cl ⁻	- Cloretos
HCl	- Ácido Clorídrico
Mg ²⁺	- Cátion Magnésio
NaCl	- Cloreto de Sódio
NaOH	- Hidróxido de Sódio
O ₂	- Oxigênio
°C	- Graus Celsius

RESUMO

A infecção crônica do trato respiratório é uma das manifestações clínicas predominantes da Fibrose Cística (FC). *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa* mucóide e não mucóide são os patógenos mais comuns na doença. Complexo *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Aspergillus* spp., micobactérias não tuberculóides e vírus respiratórios também estão entre os potenciais patógenos relacionados. Esse trabalho tem como objetivo avaliar a microbiologia das amostras dos pacientes atendidos no ambulatório de FC e estabelecer a validade da cultura bacteriana quantitativa do escarro. Pela cultura quantitativa, foram analisadas 144 amostras, que incluíam amostras de escarro e swab de orofaringe, de 38 pacientes com periodicidade de 2 a 3 meses entre cada coleta, obtendo 2 a 4 coletas de cada paciente, as quais originou-se 206 bactérias. Foi realizada a caracterização fenotípica das bactérias isoladas mais importantes em FC e estabelecida a concentração inibitória mínima (CIM) das amostras de *P. aeruginosa* e *S. aureus*. A partir dos 10 sinais e sintomas de exacerbação pulmonar, foi realizada a coleta de dados clínicos dos pacientes em prontuário para estabelecer os critérios de exacerbação pulmonar e associá-los aos dados microbiológicos. A bactéria mais isolada foi *P. aeruginosa*, 100 isolados (48,5%), considerando as cepas mucóides com 45 isolados (21,8%) e as cepas não mucóides com 55 isolados (26,7%), seguida pelo *S. aureus*, 81 isolados (39,3%), *H. influenzae*, 11 isolados (5,3%), complexo *B. cepacia*, 9 (4,4%) e outras somando 5 isolados (2,5%). A partir da contagem de colônias obtida na cultura quantitativa das amostras de escarro, foi realizada a análise de relação com os sintomas de exacerbação pulmonar obtidos pelo escore de sinais e sintomas estabelecidos neste estudo. Houve uma associação significativa entre essas duas variáveis para amostras de *S. aureus* que não se confirmou para *P. aeruginosa*. Portanto, a cultura quantitativa das amostras de pacientes com FC deve ser realizada com uma diluição a fim de se visualizar o crescimento de colônias isoladas das bactérias presentes na amostra e demonstrar a contagem de colônias indicativa de exacerbação pulmonar.

ABSTRACT

The chronic respiratory tract infection is one of the most predominant clinical manifestation in Cystic Fibrosis (CF). *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* and *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid strains are the most common disease pathogens. *Burkholderia cepacia* complex, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Aspergillus* spp., nontuberculous mycobacteria and respiratory viruses are also among the potential related pathogens. The objective of this work is to evaluate the microbiology of CF patients' samples seen at the CF ambulatory and to establish the value of bacterial quantitative culture of sputum. Through the quantitative culture, 144 samples were analyzed, which included sputum and oropharyngeal swabs, of 38 patients in a period of 2 or 3 months between each collection, obtaining 2 or 4 samples of each patient from which 206 bacteria were originated. The phenotypic characterization of the most important isolated bacteria in CF and the minimal inhibitory concentration (MIC) of *P. aeruginosa* and *S. aureus* samples were established. Ten pulmonary exacerbation signals and symptoms were obtained from patient records to establish the pulmonary exacerbation criteria and to associate them to the microbiological data. The most isolated bacterium was *P. aeruginosa* with 100 isolates (48,5%), including the mucoid strains with 45 isolates (21,8%) and the non-mucoid strains with 55 isolates (26,7%), followed by *S. aureus* with 81 isolates (39,3%), *H. influenzae* with 11 isolates (5,3%), *B. cepacia* complex with 9 (4,4%) and other bacteria with 5 isolates (2,5%). From the colony count of sputum samples quantitative culture, the relation analysis with pulmonary exacerbation obtained from the signals and symptoms scores established in this study was realized. There was a significant association between these two variables for *S. aureus* samples, which was not confirmed for *P. aeruginosa*. However, quantitative culture of CF patients' samples must be performed with one dilution in order to visualize the growth of isolated colonies from bacteria present in the samples and to demonstrate the indicative pulmonary exacerbation colony count.

1 INTRODUÇÃO

Fibrose Cística (FC), antigamente conhecida como mucoviscidose, é uma doença de caráter genético autossômico recessivo. É sistêmica, hereditária, altamente comum nas pessoas de raça branca e com uma incidência de aproximadamente um em 2500 nascidos vivos (MIMS, C., et al, 1995). No mundo inteiro, mais de 50.000 indivíduos são afetados e muito mais pessoas carregam o gene defeituoso que causa a fibrose cística (GOVAN, J. R. W.; DERETIC, V., 1996). No Brasil, não há estudos epidemiológicos abrangentes que permitam estimar a incidência da doença. A estimativa é de que menos de 10% do total anual de casos são diagnosticados (RASKIN, S. 2001; LEMOS, A. C., 2004).

Essa doença é caracterizada pela disfunção das glândulas de secreção externa do organismo como as glândulas sudoríparas, bronquiais, do intestino, do pâncreas exócrino, salivares e hepáticas. As mucosidades produzidas por essas glândulas são muito mais espessas do que o normal e dificultam a produção de enzimas do pâncreas e a expulsão das secreções mucosas dos brônquios. As obstruções geradas causam deficiências no aparelho digestivo e nas vias respiratórias, provocando, de forma especial nos pulmões, o início da colonização por diversos microrganismos de difícil erradicação (KROLL, C. M.; TERRA, J. P., 1999).

O gene da fibrose cística está localizado no braço longo do cromossomo 7 e codifica um mRNA que é transcrito em uma proteína de 1480 aminoácidos denominada regulador transmembrânico da fibrose cística ou *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (CFTR) (KROLL, C. M.; TERRA, J. P., 1999). O CFTR funciona como um canal de transporte de cloretos (Cl^-). Defeitos no gene que codifica o CFTR reduzem a capacidade do transporte de cloretos, principal problema relacionado à doença,

causando caracteristicamente o suor salgado (GOVAN, J. R. W., DERETIC, V., 1996; AKABAS, M. H., 2000). O declínio da função pulmonar ocorre devido a defeitos básicos associados à função anormal desse regulador (CFTR), resultando em desidratação das secreções originada pela disfunção combinada com o tecido danificado devido à seqüela de infecções bacterianas anteriores (GOVAN, J. R. W. & DERETIC, V., 1996).

A infecção crônica do trato respiratório é uma das manifestações clínicas predominantes da fibrose cística (FC) e é responsável por 75 a 85% das mortes entre os pacientes com FC. A susceptibilidade dos pacientes à infecção pulmonar já foi reconhecida desde a descrição da doença, em 1940 (GOVAN, J. R. W. & DERETIC, V., 1996), mas a expectativa de vida desses pacientes cresceu muito nos últimos 50 anos, principalmente pelas melhoras no tratamento da doença pulmonar nessa população, que chega a atingir, em média, 30 anos de idade, variando nos diferentes países.

O número de microrganismos associados à infecção pulmonar em pacientes com FC é relativamente limitado. *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa* mucóide e não mucóide são os patógenos mais comuns, mas o complexo *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Aspergillus* spp., micobactérias não tuberculóides e vírus respiratórios podem também ser potenciais patógenos (SAIMAN, L.; SIEGEL, J., 2004).

Pseudomonas aeruginosa é o microrganismo mais isolado em escarro de pacientes com fibrose cística. A idade de aquisição de *P. aeruginosa* varia a partir da infância até a idade adulta e a colonização crônica ocorre mais freqüentemente na adolescência, estando comumente associada ao declínio progressivo da função pulmonar. (SAIMAN, L.; SIEGEL, J., 2004).

A presença de anticorpos anti-pseudomonas pode sugerir que a bactéria está presente no trato respiratório do paciente com fibrose cística. Existe uma boa correlação entre culturas respiratórias e altos níveis de anticorpos anti-*P. aeruginosa*.

Por outro lado, um nível normal de anticorpos sugere que não houve invasão tecidual por *P. aeruginosa* e conseqüentemente não houve resposta imune. Nestas circunstâncias, se as culturas são negativas, é pouco provável que *P. aeruginosa* esteja contribuindo com os problemas respiratórios, ou seja, com a exacerbação pulmonar do paciente, caso contrário, seria indicativo de colonização invasiva. (ELBORN, J. S., et al, 1993).

Até o advento da antibioticoterapia, a maioria dos pacientes com FC morriam ainda na infância devido a infecções estafilocócicas. Atualmente os novos pacientes diagnosticados podem chegar a ter a expectativa de atingir a idade adulta até aproximadamente 30 anos. Além disso, a terapia antibiótica agressiva com aumento da oferta de novos antibióticos tem contribuído para o controle das infecções por *S. aureus* e *H. influenzae*. Em contraste, o uso dos agentes anti-pseudomonas raramente resulta na erradicação da *P. aeruginosa*. Atualmente, a maioria dos pacientes com FC eventualmente sucumbe devido a seqüelas adquiridas por exacerbações da colonização persistente por *P. aeruginosa*, principalmente entre 10 e 20 anos de idade. Portanto, o diagnóstico e o tratamento precoce das infecções pulmonares são particularmente importantes em pacientes jovens, uma vez que a instituição precoce da antibioticoterapia correta pode evitar ou retardar a colonização por esse microrganismo (GOVAN, J. R. W. & DERETIC, V., 1996).

A técnica de cultura quantitativa (CQ) de escarro em pacientes com fibrose cística tem sido utilizada para identificar corretamente o patógeno predominante e representativo da infecção (WONG K., et al, 1984). Essa técnica serve também para recuperar microrganismos que podem não ser isolados devido ao crescimento abundante de *P. aeruginosa* no meio que poderia esconder o crescimento de outras bactérias, como por exemplo, *H. influenzae* (MILLER, M. B.; GILLIGAN, P. H., 2003).

A correlação entre a exacerbação dos sintomas pulmonares e a contagem de colônias de bactérias na cultura quantitativa das amostras dos pacientes com fibrose cística serve para orientar o controle das infecções. Juntos, os estudos do modo de aquisição das bactérias que causam infecções em pacientes com FC, a correta e eficaz identificação desses microrganismos e o controle da infecção paciente-paciente (SAIMAN, L; SIEGEL, J., 2004), possibilitam combater essas infecções, retardar a colonização e manter a boa função pulmonar.

2 OBJETIVO GERAL

Estudar a microbiologia das amostras de pacientes atendidos no ambulatório de Fibrose Cística (FC) do Hospital de Clínicas de Curitiba e verificar a validade da cultura bacteriana quantitativa do escarro.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar a cultura quantitativa de escarro induzido para pacientes com FC;
2. Determinar os microrganismos mais isolados nos pacientes com FC;
3. Estudar a sensibilidade das bactérias mais freqüentemente isoladas frente aos antibióticos utilizados no tratamento clínico dos pacientes com FC;
4. Avaliar a importância da análise da qualidade do escarro pela coloração de Gram através da presença de células do trato respiratório e sua relação com a cultura;
5. Avaliar a relação entre a contagem de colônias e a exacerbação dos sintomas pulmonares da doença pulmonar do paciente com FC.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HISTÓRICO DO ESTUDO

Antes de 1938 a fibrose cística foi reconhecida como uma coleção de diversas síndromes clínicas do trato alimentar e respiratório. Enquanto os defeitos desse sistema eram aparentes após os 6 meses de idade, os defeitos do trato alimentar eram mais pronunciados em indivíduos mais jovens, quando a dificuldade de se alimentar e ganhar peso eram sintomas notáveis.

Os primeiros estudos da fibrose cística, também chamada de doença fibrocística do pâncreas ou mucoviscidose, foram enfraquecidas por diversos obstáculos. O principal dentre estes obstáculos era o pequeno número de amostras de indivíduos afetados incluídos nos estudos. Este fato complicou as estimativas da frequência da população de fibrose cística e, conseqüentemente atrasou a caracterização da sua base genética. Apesar das múltiplas manifestações clínicas da fibrose cística serem reconhecidas por representar a doença, o diagnóstico definitivo era possível somente em autópsia, uma vez que informações na ocorrência familiar eram freqüentemente não avaliáveis (LYCZAC, J. B., et al, 2002).

Os estudos da base genética da fibrose cística avançaram em 1938, quando foi publicado um estudo detalhado de 49 pacientes de fibrose cística. (ANDERSEN D. H., 1938). Esses casos foram categorizados em 3 grupos baseados na idade de morte dos pacientes. A síndrome foi descrita em crianças que tinham abdome distendido e ataques de diarreia com fezes abundantes, pálidas e de odor fétido. Foi descoberto que esse material continha baixa porcentagem de gorduras processadas. As observações feitas no estudo permitiram entender a fibrose cística como uma doença única, mas

com diversos efeitos, melhor do que uma coleção de estados de doenças relacionadas. A designação “Fibrose Cística do pâncreas” foi derivada da descoberta de que as crianças que morriam no período neonatal tinham lesões histopatológicas características no pâncreas. O trabalho de Andersen descreveu dois problemas fisiopatológicos importantes encontrados na FC: insuficiência pancreática relacionada à má nutrição bem como infecções das vias aéreas. Ambas estão relacionadas com a descoberta de que esses pacientes produziam secreções extremamente viscosas (GILLIGAN, P. H., 1991). Mais tarde foi demonstrado que o suor dos pacientes de fibrose cística continha concentrações altamente anormais de sódio, cloreto e potássio (DISAINT’AGNESE, P. A., et al, 1953).

Nesta época, a fibrose cística era vista como uma doença do trato digestivo, como descrito em 1951 (BAGGENSTOSS, A. H., et al, 1951). A natureza fisiológica do defeito da doença era a má formação dos dutos pancreáticos que levavam a uma secreção defeituosa de várias glândulas epiteliais (LYCZAC, J. B., et al. 2002).

Em 1958 foi padronizado por Gibson e Cooke, (GIBSON, L. E.; COOKE, R. E., 1959) o teste do suor como o padrão ouro para diagnóstico de FC, utilizado até hoje (RIBEIRO, J. D., et al, 2002).

Em 1985 o gene responsável pela FC foi localizado em uma região específica do cromossomo 7 (TSUI, L. C., 1995). Acreditava-se que o produto específico defeituoso deste gene estava presente em uma proteína transmembrânica que os investigadores chamaram de regulador de condução da FC. Em 68% dos pacientes desse estudo, uma mutação foi detectada onde um resíduo de fenilalanina foi deletado na posição 508 do regulador de condução da FC. Essa mutação tem sido designada como $\Delta F-508$ (GILLIGAN, P. H., 1991).

Em 1989, o gene da FC foi clonado e seqüenciado e a partir daí os estudos relacionados à sua função começaram a avançar (RIBEIRO, J. D., et al, 2002). Em

1990 o regulador transmembrânico da fibrose cística (CFTR) foi descrito como sendo um canal de cloretos (GOVAN, J. R. W.; DERETIC, V., 1996).

Mais recentemente, foi proposto que a disfunção da fibrose cística era devida ao desequilíbrio na utilização de ácidos graxos livres nos fosfolipídeos dos pacientes. Foi reportado que os fosfolipídeos do regulador transmembrânico da fibrose cística (CFTR) em ratos contém ácido araquidônico em maior proporção que o normal, às custas do ácido docosahexaenóico (DHA), sugerindo que os defeitos fisiológicos na fibrose cística não eram devido à inabilidade de absorção intestinal de certos ácidos graxos, mas devido a um defeito na síntese ou utilização desses ácidos graxos (FREEDMAN, S. D., et al, 1999).

Estudos bacteriológicos nos pulmões de pacientes com fibrose cística começaram na virada do século XXI. Como o tratamento para a doença tem melhorado no decorrer dos anos, a média de sobrevida dos pacientes com a doença aumentou muito. Enquanto que essencialmente todos os pacientes antes dos anos 50 morriam com idade até 10 anos, entre 1950 e 1960 houve um aumento considerável na proporção de sobrevivência de pacientes além dessa idade (LYCZAC, J. B., et al, 2002). A porcentagem de pacientes que morriam no primeiro ano de vida caiu de 40% nos anos 60, para menos de 10% nos anos 80 (BARTH, A. L.; PITT, T. L., 1998). Nos meados de 1990, aproximadamente um terço dos pacientes sobreviviam até a idade adulta (LYCZAC, J. B., et al, 2002).

Desde os anos 90, estudos de terapia gênica começaram a evoluir a partir da substituição do gene da FC defeituoso realizada com sucesso em experimentos feitos em laboratório de cultura celular. (GOVAN, J. R. W.; DERETIC, V., 1996). A possibilidade teórica de corrigir o fenótipo da FC estava perto da realidade, porém por causa da função do gene que codifica o CFTR no processo patológico não estar completamente compreendida, não está totalmente claro ainda o quanto a expressão

do CFTR precisará ser eficiente a ponto de reverter o ciclo da infecção, inflamação e obstrução que constituem a doença (FLOTTE, T. R.; LAUBE, B. L., 2001).

3.2 DIAGNÓSTICO

Em geral, o diagnóstico da fibrose cística é feito clinicamente, além do que o uso do teste do pezinho, ou triagem neonatal para tripsina imunorreativa (TIR) é utilizado para diagnóstico precoce logo após o nascimento mesmo apresentando sensibilidade e especificidade relativamente baixas. Clinicamente, a fibrose cística freqüentemente apresenta uma constelação típica de sintomas incluindo infecções respiratórias crônicas e anormalidades gastrintestinais levando a uma má absorção e déficit nutricional (RIBEIRO J. D., et al, 2002).

Em 2001, o Programa de Triagem Neonatal foi aprovado e coube ao laboratório da Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE-PR) a sua implantação, concretizando a sua realização no Paraná. Antes da instituição do programa, a idade média de diagnóstico no nosso estado era de 1,6 anos. Essas crianças já apresentavam, no momento do diagnóstico, uma desnutrição importante e colonização pelos microrganismos envolvidos na FC, além da morbidade envolvida até o diagnóstico (FARIAS, L. et al, 1997).

Segundo a avaliação do Programa de Triagem Neonatal realizada após 30 meses de sua implantação no Paraná (SANTOS, G. P. C., et al, 2005), a percentagem de crianças diagnosticadas, considerando-se o número total de crianças triadas, foi satisfatória, após análise em duas amostras da TIR, confirmação pelo teste de condutividade do suor e teste do suor com estimulação, visto que o número de diagnósticos por ano dobrou (SANTOS, G. P. C., et al, 2005).

A importância do diagnóstico precoce indiscutivelmente está nas repercussões sobre o estado nutricional, permitindo a prevenção da desnutrição com suas implicações sobre o aparelho respiratório e cognitivo (WAGENER, J. S., et al, 2001). Como no Brasil a idade média no diagnóstico é de cerca de 4 anos (ALVAREZ, A. E., et al, 2004), e como isso pode se tornar catastrófico ao paciente fibrocístico, os benefícios da triagem neonatal no nosso país parecem inegáveis, conforme os dados de Santos e colaboradores. Além disso, o diagnóstico precoce tem proporcionado aos profissionais que acompanham essas crianças, um melhor conhecimento sobre a doença e sua história natural, e aos pais procederem os cuidados no primeiro ano de vida e a oportunidade do planejamento familiar (SANTOS, G. P. C. et al, 2005).

O padrão ouro para diagnóstico definitivo da fibrose cística o teste do suor. Uma concentração de cloreto acima de 60 mEq/litro, é dado como resultado positivo quando determinada em duas ou mais ocasiões pela análise iônica quantitativa de suor estimulada através de iontoforese por pilocarpina e dosagem de sódio e/ou cloro por fotometria de chama (LYCZAC, J. B., et al. 2002). É um exame de baixo custo, com elevada sensibilidade e especificidade (> 95%) e não invasivo (RIBEIRO J. D., et al, 2002).

Nos países desenvolvidos, a maioria dos pacientes tem diagnóstico firmado antes dos dois anos de idade. No Brasil, 40 a 50% dos casos são diagnosticados após 3 anos de idade. Por ordem de especificidade, o diagnóstico de FC deveria ser realizado: 1) pelo achado de duas mutações no gene FC, ou 2) por dois testes do suor alterados, ou 3) pela presença de pelo menos uma das seguintes manifestações clínicas epidemiológicas:

- Doença pulmonar obstrutiva / supurativa ou sinusal crônica;
- Insuficiência pancreática exócrina crônica;
- História familiar de FC;

- Para o diagnóstico de FC, ainda pode-se contar com a triagem neonatal pelo método da tripsina imunorretiva (TIR), já mencionado anteriormente, ou ainda na diferença de potencial na mucosa nasal, método pouco difundido na rotina diagnóstica.

Aproximadamente 90% dos pacientes têm insuficiência pancreática exócrina. Os pacientes portadores de FC com suficiência pancreática são caracterizados por um curso clínico mais suave, melhor função pulmonar e diagnóstico mais tardio. A variabilidade da expressão fenotípica é dependente de fatores como mutações do gene, carga genética e fatores ambientais (LEMOS, A. C., 2004).

Como a FC pode afetar vários órgãos, muitos outros testes, além do teste do suor, podem ser realizados para a confirmação do diagnóstico, como a determinação dos níveis de enzimas pancreáticas, que estão reduzidos; a análise das fezes do paciente pode revelar níveis diminuídos ou ausentes de tripsina e quimiotripsina ou níveis elevados de gordura; se a secreção de insulina estiver reduzida, os níveis de açúcar no sangue são altos; testes de função pulmonar podem mostrar comprometimento respiratório; a radiografia de tórax também pode sugerir a doença (KROLL, C. M.; TERRA, J. P., 1999).

É importante salientar que o teste de suor normal não exclui o diagnóstico de formas atípicas de FC. Atualmente os casos duvidosos podem ser confirmados através do estudo genético.

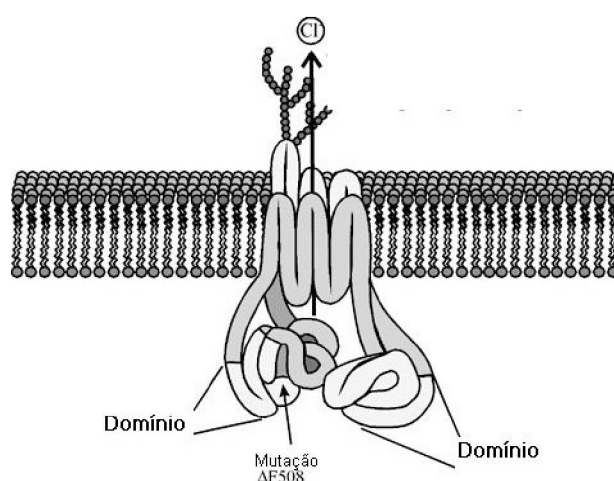
A identificação de duas mutações conhecidas confirma o diagnóstico de FC, sendo decisivo naquele paciente que apresenta quadro clínico compatível e teste do suor não conclusivo. A análise das mutações é de alto custo, e, no Brasil, são poucos os centros capacitados para realizá-la (RIBEIRO J. D., et al, 2002).

3.3 REGULADOR TRANSMEMBRÂNICO DA FIBROSE CÍSTICA (CFTR)

A função biológica do regulador transmembrânico da fibrose cística ou *Cystic Fibrosis transmembrane regulator* começou a ser decifrada em 1953 com a observação de que o suor dos pacientes continha altos níveis de eletrólitos (DISANT'AGNESE, P. A., et al, 1953). Normalmente, como as secreções isotônicas viajam das glândulas sudoríparas para a superfície da pele, as células epiteliais dos ductos reabsorvem NaCl resultando em suor hipotônico. Porém, os ductos de suor de pacientes com fibrose cística são impermeáveis aos cloretos. Portanto, o NaCl continua nas secreções e o suor é salgado.

O gene da Fibrose Cística (FC) codifica o CFTR que é uma proteína de 1480 aminoácidos. O CFTR é um canal de cloreto (Figura 1) cuja maior função está no processo de absorção/secreção de cloretos das células epiteliais. Esse canal pode ser detectado no epitélio de alguns órgãos como pâncreas, glândulas sudoríparas, ductos genitais masculinos, túbulos renais, pulmões, jejuno e cólon (BARTH, A. L.; PITT, T. L., 1998).

FIGURA 1 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO CANAL DE CLORETO



O maior determinante do transporte epitelial de cloretos é o nível de ativação do CFTR que depende do nível de fosforilação determinado pelas atividades relativas de quinases e fosfatases, que normalmente são reguladas por hormônios. (AKABAS, M. H., 2000).

A estrutura, função, regulação, biogênese, degradação, causa do defeito na condução de cloretos e o modo de herdá-lo foram determinados em 1989, quando o gene CFTR foi identificado e clonado. Esse gene foi clonado sem nenhum conhecimento de sua função. Experimentos confirmaram a localização do gene CFTR no braço longo do cromossomo 7. (TSUI, L. C., 1995)

Com relação à regulação do CFTR, dois processos separados controlam a passagem no canal: a fosforilação e a ligação e hidrólise do ATP. A fosforilação é necessária para a ativação do canal, mas não é suficiente. Após a fosforilação, a passagem entre os estados de abertura e fechamento do canal é controlada pela hidrólise de ATP. Quanto maior a fosforilação, maior é a probabilidade de abertura do canal. A desativação do canal é mediada por fosfatases protéicas (AKABAS, M. H., 2000).

Portanto, o CFTR regula o transporte apical de íons por vários mecanismos. O primeiro destes mecanismos é a função natural do CFTR como um canal de cloreto. Segundo, o domínio R da CFTR pode associar e regular a atividade do canal de potássio. Terceiro, o CFTR media o transporte de ATP através da membrana plasmática. Este ATP extracelular pode então se ligar ao receptor purigênico que regula a atividade de outro regulador, o ORCC – *Outwardly rectifying chloride channel* ou canal de cloreto que retifica externamente. Por último, existem evidências de que o CFTR pode estimular diretamente a atividade de importação de cloreto e reprimir o canal de sódio (LYCZAC, J. B., et al., 2002).

Mais de 1000 mutações naturais foram identificadas no gene que codifica o CFTR. Algumas mutações têm um fenótipo completamente normal enquanto outras causam impacto severo em vários sistemas de órgãos na fibrose cística.

Apesar das diferentes categorias de mutação, a anormalidade no gene da FC irá invariavelmente provocar um transporte anormal de íons na superfície da célula epitelial e, como consequência, irá causar a desidratação das secreções (BARTH, A. L.; PITT, T. L., 1998).

A principal mutação mais conhecida identificada no gene da FC é a deleção de 3 pares de bases que levam à ausência da fenilalanina na posição 508 da proteína CFTR ($\Delta F 508$). Isso resulta em uma célula epitelial onde a proteína CFTR está ausente na membrana plasmática e, conseqüentemente, há uma falha no transporte de cloretos. Essa mutação ocorre em torno de 70% dos casos no norte da Europa e pode variar significativamente entre os diferentes grupos étnicos (BARTH, A. L.; PITT, T. L., 1998).

Segundo o estudo de Alvarez e colaboradores (2004) a frequência da mutação $\Delta F 508$ chegou a 50% dos casos bem como o estudo de Raskin (2001) cuja frequência chegou a 47%. Segundo os autores, a menor incidência dessa mutação em nosso meio quando comparada aos dados dos Estados Unidos, França e Argentina provavelmente ocorre devido à grande miscigenação de raças no Brasil (ALVAREZ, A. E., et al, 2004).

3.4 MICROBIOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA

A suscetibilidade a infecções pulmonares crônicas em pacientes com fibrose cística tem sido reconhecida desde as primeiras descrições da doença. No sistema respiratório, o trato superior é colonizado por uma grande variedade de microrganismos que incluem a microbiota normal enquanto o trato respiratório inferior é mantido em um estado estéril pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. Estes defensores consistem

em barreiras físicas e barreiras endocíticas e fagocíticas. A falha em qualquer dessas barreiras resulta na suscetibilidade à infecção pulmonar (LYCZAK, J. B., et al, 2002).

A infecção pulmonar crônica de pacientes com fibrose cística está normalmente associada com um número limitado de microrganismos. Dois patógenos principais, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* são os mais recuperados do trato respiratório em pacientes cronicamente infectados. Outros microrganismos encontrados em algum grau de frequência no trato respiratório dos pacientes com fibrose cística incluem *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Streptococcus pneumoniae*. O papel de outros patógenos como as micobactérias não tuberculóides, vírus e fungos, especialmente *Aspergillus* spp., está começando a ficar mais claro nas doenças pulmonares de pacientes com fibrose cística (GILLIGAN, P. H., 1991; SAIMAN, L.; SIEGEL, J., 2004).

Outros microrganismos podem ser isolados das secreções de pacientes com FC, incluindo bactérias aeróbias como *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Serratia* sp. e ainda bactérias anaeróbias (ROZOV, T., 1999), porém não representam papel importante em FC.

3.4.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é o primeiro microrganismo a causar infecções crônicas em pacientes jovens com fibrose cística. Na era pré-antibiótica, infecções pulmonares devido a esse microrganismo eram a principal causa de mortalidade. Continua sendo o principal patógeno, especialmente em pacientes com menos de 10 anos (GILLIGAN, P. H., 1991; SAIMAN, L.; SIEGEL, J., 2004).

Nos primeiros estudos de pacientes com FC, em 1938, quando a média de sobrevida era de dois anos, todos os pacientes que viviam mais de uma semana

eventualmente morriam devido a complicações pulmonares em que *S. aureus* era freqüentemente a causa. Ainda antes dos anos 50, a infecção estafilocócica era a maior causa de insuficiência respiratória nos pacientes que chegavam aos 10 anos de idade (BARTH, A. L.; PITT, T. L., 1998).

3.4.1.1 Epidemiologia e impacto clínico

Antes do advento da antibioticoterapia, *S. aureus* era o primeiro agente em pacientes com FC, apesar de que não estava claro se esta situação era devido a um defeito primário do sistema imune inato dos pulmões ou se era secundário a outro aspecto da FC como a má nutrição. Porém, desde que a antibioticoterapia está sendo amplamente utilizada para tratar *S. aureus* em pacientes com FC, dados recentes indicando o papel primário da patogênese de *S. aureus* na doença pulmonar da FC estão em falta. O uso da terapia anti-estafilocócica em várias partes do mundo levantou a questão sobre o tratamento profilático que pode aumentar a suscetibilidade a infecções por outros agentes como *H. influenzae* e *P. aeruginosa*. A colonização crônica por *P. aeruginosa* é reduzida em regiões onde a terapia anti-estafilocócica é administrada estritamente em uma base necessária, não profilática (LYCZAK, J. B., et al, 2002).

Isolados clínicos resistentes à oxacilina estão sendo reconhecidas com alta freqüência nos pacientes com fibrose cística. Estudos moleculares epidemiológicos mostram que pacientes com *S. aureus* oxacilina resistentes freqüentemente adquirem o microrganismo quando são hospitalizados e isso provavelmente reflete as diferenças na idade, severidade da doença, exposição a antibióticos e aquisição associada a tratamentos profiláticos. Alguns pacientes tornam-se cronicamente infectados com

estes microrganismos enquanto outros podem ser somente portadores (MILLER, M. B.; GILLIGAN, P. H., 2003; SAIMAN, L.; SIEGEL, J., 2004).

3.4.1.2 Fatores de virulência

Os fatores específicos relacionados às infecções estafilocócicas na FC são pouco compreendidos. A crescente viscosidade das secreções aéreas e o reduzido *clearance* mucociliar podem ser significativos, mas não explicam necessariamente a seletividade do *S. aureus*. Foi descoberto, além disso, que o *S. aureus* da FC também se liga mais intensamente às células epiteliais escamosas nasais e bucais. Esses resultados aparentemente indicam que existem cepas de *S. aureus* que aumentaram a capacidade de afinidade em atingir as células de FC e não que as células de FC tenham receptores seletivos para *S. aureus*. (BARTH, A. L.; PITT, T. L., 1998).

Além da aderência, *S. aureus* dispõe de uma variedade de outros fatores de virulência, assim como leucocidinas, catalase e proteína A que sugerem evadir a resposta do hospedeiro, bem como as hemolisinas, coagulase e várias outras toxinas que contribuem para a sua patogenicidade (GILLIGAN, P. H., 1991).

3.4.1.3 Transmissão

A transmissão paciente-paciente pode ocorrer com *S. aureus*. Tanto a transmissão das cepas oxacilina-sensíveis (MSSA) ou das cepas de MRSA se dá entre pacientes com FC ou até mesmo sem FC, principalmente MRSA entre pacientes hospitalizados (SAIMAN, L.; SIEGEL, J., 2004).

3.4.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Com o advento da antibioticoterapia estafilocócica, *P. aeruginosa* emergiu como o principal patógeno em doenças pulmonares de pacientes com fibrose cística (GILLIGAN, P. H., 1991). Estudos mostraram que as infecções por *P. aeruginosa* em pacientes com FC podem ser verificadas desde a infância (MILLER, M. B.; GILLIGAN, P. H., 2003).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são aeróbias, não formadoras de esporos, bacilos gram negativo retos ou levemente curvos. São móveis devido à presença de um ou mais flagelos polares. Os isolados clínicos são oxidase positiva, catalase positiva e crescem em ágar MacConkey, não oxidando a lactose. A maioria das espécies degrada a glicose oxidativamente e convertem o nitrato tanto a nitrito quanto a gás nitrogênio. Essas bactérias são nutricionalmente versáteis, com diferentes espécies que são capazes de utilizar uma variedade de carboidratos simples ou complexos, álcoois e aminoácidos como fontes de carbono. A maioria das espécies é mesófila com crescimento ótimo em temperaturas entre 30 e 37°C (KISKA, D. L.; GILLIGAN, P. H., 2003).

Pseudomonas aeruginosa é o patógeno humano mais importante do gênero *Pseudomonas*. Os pacientes com FC, uma vez infectados por esse patógeno, raramente são descolonizados.

Os membros do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas*, entre eles *P. aeruginosa*, produzem pioverdina, um pigmento amarelo-esverdeado ou amarelo-âmbar solúvel em água que é fluorescente em um curto comprimento de onda UV. A maioria dos isolados de *P. aeruginosa* é fácil de ser reconhecida em isolamento primário com base na morfologia e características coloniais, produção de pigmentos difusíveis e odor de uva. *P. aeruginosa* produz outros pigmentos além da pioverdina,

dentre eles, a piocianina, principal pigmento e único apresentado somente por *P.aeruginosa*, e a piorrubina. Essa espécie pode ser identificada através da reação da oxidase positiva, crescimento a 42°C e produção de pigmento em ágar Mueller-Hinton. As cepas mucóides de *P. aeruginosa* podem freqüentemente não produzir pigmento. Para estas cepas, o achado de colônias mucóides, não fermentadoras da glicose e constituídas de bacilos gram negativos pode complementar a identificação preliminar. (KISKA, D. L.; GILLIGAN, P. H., 2003)

3.4.2.1 Epidemiologia e impacto clínico

Pseudomonas aeruginosa é o patógeno mais comum e clinicamente importante em pacientes com FC. Na idade adulta, mais de 80% dos pacientes estão infectados ou colonizados com este patógeno, afetando a função pulmonar. Crianças infectadas com *P.aeruginosa* possuem função pulmonar mais deficiente, piores escores de raio-X pulmonar e tempo de sobrevida menor do que crianças não infectadas. O fenótipo mucóide tem sido associado com aumento da deterioração da função pulmonar e morte precoce. Através dos tempos, as cepas de *P. aeruginosa* se tornaram resistentes a agentes antimicrobianos e a terapia efetiva tem se tornado progressivamente mais difícil (SAIMAN, L.; SIEGEL, J., 2004).

A maioria dos pacientes carrega o mesmo clone de *P. aeruginosa* durante sua vida. Porém, um único paciente pode possuir mais de um clone. Pacientes que são tratados com terapia antibiótica para erradicar *P. aeruginosa* podem ter infecções recorrentes com a cepa inicial após supressão transitória (SAIMAN, L.; SIEGEL, J., 2004).

A grande maioria dos estudos epidemiológicos de *P. aeruginosa* tem como objetivo prover informações em três maiores tópicos: 1) a origem da aquisição das

cepas; 2) o mecanismo da persistência das cepas; e 3) a existência de infecção cruzada entre os pacientes.

O desenvolvimento da tipagem de DNA, particularmente a análise de macrorrestrição altamente discriminatória de todo o cromossomo bacteriano por eletroforese em campo pulsado, trouxe uma melhor compreensão dos tipos e padrões de propagação das cepas em pacientes com FC (BARTH, A. L.; PITT, T. L., 1998).

3.4.2.2 Fenótipo mucóide

Uma das características clinicamente mais importantes da infecção por *P.aeruginosa* é a tendência dessa bactéria de mudar para um morfotipo colonial mucóide, provavelmente iniciando um estágio crônico-infectante da doença. (LYCZAK, J. B., et al, 2002).

O morfotipo mucóide resulta da produção bacteriana em grande escala de polissacarídeos que cercam a célula. Esse material foi designado como *mucoïd exopolyssacaride* ou MEP (exopolissacarídeo mucóide). O material a que se referem os estudos é um polímero composto por ácido D-manurônico acetilado e ácido L-glucurônico e é comumente chamado alginato. Estudos com técnicas imunoquímicas comprovam que todas as cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC produzem MEP, até mesmo aquelas classificadas como não mucóides. (GILLIGAN, P. H., 1991). Este polissacarídeo faz um grande papel na evasão bacteriana da resposta imune do hospedeiro (LYCZAK, J. B., et al, 2002).

Um dos estudos teóricos sugere que a maior função do alginato pode ser a formação de microcolônias em biofilme (GOVAN, J. R. W.; DERETIC, V., 1996). Um aspecto da patogênese da infecção pulmonar crônica em FC é essa habilidade de

P. aeruginosa crescer como um biofilme, o que aumenta a resistência bacteriana frente à fagocitose e aos antibióticos (LYCZAK, J. B., et al, 2002).

3.4.2.3 Fatores de virulência

Os isolados de *P. aeruginosa* produzem numerosos fatores de virulência, incluindo exotoxina A, exoenzima S, elastase, protease alcalina, pioverdina, dois tipos de hemolisinas, lipopolissacarídeos, pili e MEP (GILLIGAN, P. H., 1991).

A aderência da *P. aeruginosa* ao epitélio respiratório e/ou à mucosa respiratória, parece ser a principal responsável pelo papel no processo inicial de colonização. O epitélio prejudicado por infecção viral ou colonização prévia por outra bactéria, predispõe à fixação da bactéria ao tecido. Acredita-se que *P. aeruginosa* adere ao epitélio primário por meio de pili, mas a exoenzima S e o alginato também possuem propriedades aderentes (BARTH, A. L.; PITT, T. L., 1998).

P. aeruginosa na sua forma mucóide é a mais virulenta, podendo ser encontrada em pacientes com infecções graves muitas vezes no mesmo paciente onde já existe na sua forma não mucóide. Estudos revelam que a distinção destas formas da bactéria é importante para o modo do tratamento. Muitas vezes a forma mucóide e não mucóide podem ser originadas da mesma cepa, porém podem apresentar perfil bioquímico e de suscetibilidade a antibióticos muito diferentes. (MILLER, M. B.; GILLIGAN, P. H., 2003)

3.4.2.4 Resposta imune

A infecção crônica das vias aéreas por *P. aeruginosa* e o acompanhamento da resposta inflamatória são hoje claramente os maiores problemas clínicos para o paciente com FC. Durante a última década, a proeminente contribuição da inflamação

para a destruição tecidual e perda da função tem sido observada em numerosos estudos. Terapias antiinflamatórias têm mostrado produzir uma melhora clínica em pacientes infectados. Vários estudos têm sugerido que a inflamação e a infecção bacteriana podem começar em uma idade precoce antes dos sintomas aparecerem. Portanto, há um interesse considerável em determinar a contribuição da infecção e inflamação precoce para o progresso da doença pulmonar em FC (LYCZAK, J. B., et al, 2002).

Existe produção pronunciada de anticorpos pelo sistema imune do paciente com FC em resposta à colonização inicial por *P. aeruginosa*. A resposta imune humoral dos pacientes com FC é normal, pois formam anticorpos eficientes contra ambas proteínas e antígenos polissacárides de *P. aeruginosa*. A resposta imune humoral aumentada em alguns pacientes com FC está associada a um pobre prognóstico (BARTH, A. L.; PITT, T. L., 1998).

Vários fatores do hospedeiro que representam componentes do sistema imune inato são estimulados por *P. aeruginosa* no pulmão com FC, mas eventualmente eles falham. A falha na defesa atribuída ao hospedeiro pode estar relacionada aos alelos mutantes do gene *CFTR*. No entanto, fatores da bactéria também contribuem aparentemente para a resposta imune inata inadequada na eliminação de *P. aeruginosa* do trato respiratório. A produção do alginato em *P. aeruginosa* também é responsável por reduzir a quimiotaxia dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) nos pulmões e por si próprio inibe a ativação do sistema complemento. Como já mencionado, as células de *P. aeruginosa* mucóide são inerentemente resistentes à fagocitose por ambos PMN e macrófagos, comparando-se com cepas não-mucóides. Tal situação pode ser exacerbada pela ligação da bactéria aos fatores do hospedeiro como mucinas respiratórias ou pelo crescimento em forma de biofilme (LYCZAK, J. B., et al, 2002).

Alguns pacientes com FC podem sobreviver até a idade adulta sem se tornarem cronicamente colonizados ou infectados com *P. aeruginosa* mucóide. Estudos demonstraram que estes pacientes possuem anticorpos “opsonofagocíticos” específicos para o MEP. Os pacientes colonizados também possuem esse tipo de anticorpo, mas não são específicos para MEP. Essas informações sugerem que, se uma resposta imune pudesse ser montada especificamente para o MEP, os pacientes com FC poderiam ser protegidos da infecção por *P. aeruginosa*. Essa observação teve implicações importantes para o desenvolvimento de vacinas contra esse microrganismo (GILLIGAN, P. H., 1991).

É aparente, porém, que a resposta imune para *P. aeruginosa* mucóide não é efetiva na eliminação deste patógeno. E mais, esta resposta não efetiva provavelmente contribui significativamente para os processos inflamatórios que causam danos ao tecido pulmonar dos pacientes com FC. A principal hipótese para a falha da resposta imune é que esta se constitui de anticorpos específicos para o MEP que falham na mediação da opsonização (LYCZAK, J. B., et al, 2002).

3.4.2.5 Transmissão e vias de aquisição

Os pacientes de FC podem adquirir a bactéria de uma variedade de fontes ambientais até mesmo de piscinas para hidroterapia e, apesar da infecção cruzada ser a maior preocupação entre os pacientes de FC, o grau de segregação de *P. aeruginosa* em pacientes não infectados e infectados varia de acordo com o centro de tratamento (BARTH, A. L.; PITT, T. L., 1998).

A recente habilidade de identificar pela tipagem do DNA a transmissão de patógenos, particularmente *P. aeruginosa* entre pacientes com FC, tem levado a um maior cuidado na prática clínica em vários centros de tratamento, principalmente em

sessões de fisioterapia. Isso deve envolver todos os grupos de pacientes respiratórios com doenças pulmonares supurativas, pois a transmissão pode ocorrer entre pacientes fibrocísticos e não-fibrocísticos, o que poderia causar danos a ambos (ROBINSON, P. et al, 2003).

A transmissão paciente-paciente geralmente resulta de um contato prolongado entre eles. Foi documentado por vários pesquisadores que os pacientes com FC podem inclusive carregar a mesma cepa de *P. aeruginosa* (SAIMAN, L.; SIEGEL, J., 2004).

3.4.3 Complexo *Burkholderia cepacia*

B. cepacia foi primeiramente descrita como um patógeno significativo entre os pacientes com fibrose cística em meados dos anos 80. Estudos subsequentes mostraram que *B. cepacia* inclui pelo menos nove variantes genômicas ou espécies genômicas, todas referentes ao complexo *B. cepacia*, conforme a Tabela 1. (MILLER, M. B.; GILLIGAN, P. H., 2003)

TABELA 1 - VARIANTES GENÔMICAS E DESIGNAÇÃO DA ESPÉCIE DO COMPLEXO *B. cepacia*

Variante genômica	Designação da espécie
I	<i>B. cepacia</i>
II	<i>B. multivorans</i>
III	<i>B. cenocepacia</i>
IV	<i>B. stabilis</i>
V	<i>B. vietnamiensis</i>
VI	Não nomeada
VII	<i>B. ambifaria</i>
VIII	<i>B. anthina</i>
IX	<i>B. pyrrocinia</i>

FONTE: MILLER, M. B.; GILLIGAN, P. H. Laboratory Aspects of Management of Chronic Pulmonary Infections in Patients with Cystic Fibrosis. Journal Clin. Microbiol., v. 9, n. 41, p. 4009-4015, 2003.

3.4.3.1 Epidemiologia e impacto clínico

O primeiro caso de colonização pulmonar por *B. cepacia* em pacientes com FC apareceu nos anos 70 (GOVAN, J. R. W.; DERETIC, V., 1996). Nas últimas décadas tem ocorrido um aumento da incidência de colonização por esta bactéria em pacientes com FC e surtos têm ocorrido em alguns centros (HENRY, D. A., et al, 1997). A colonização pulmonar por *B. cepacia* em pacientes com FC é geralmente refratária ao tratamento antibiótico levando aproximadamente 30% desses pacientes a uma rápida evolução clínica fatal no período de um ano da aquisição desse microrganismo. Muitos pacientes sucumbiam pela “síndrome de *B. cepacia*” que se caracterizava por pneumonia necrotizante com febre, bacteremia, elevação da média de sedimentação de eritrócitos e leucocitose, que culminavam em uma rápida e fatal deterioração clínica (GOVAN, J. R. W.; DERETIC, V., 1996).

A epidemiologia de *B. cepacia* em FC parece ser diferente do padrão aceitável para *P. aeruginosa*. Pacientes com espécies posteriores são geralmente colonizados por cepas únicas. Há evidências da existência de uma cepa epidêmica de *B. cepacia* em alguns centros de FC (BARTH, A. L.; PITT, T. L., 1998).

O rápido crescimento de *P. aeruginosa* nos meios de cultura pode dificultar o isolamento de outros microrganismos, incluindo *B. cepacia*, que contribuem para o progresso da doença pulmonar em pacientes com fibrose cística. Eventualmente o isolamento de *B. cepacia* no escarro de pacientes colonizados por longo tempo não tem sido efetivo, causando controvérsias na padronização do tratamento dos pacientes. Daí a necessidade da utilização de um meio de cultura seletivo para isolamento deste microrganismo (CAMPBELL III, et al, 1995).

A utilização de um meio seletivo para o isolamento primário desse microrganismo é muito importante para não descartar totalmente a presença de *B. cepacia* no escarro

do paciente com FC. As técnicas de diagnóstico molecular também são importantes para diferenciar *B. cepacia* de *Burkholderia gladioli*, um microrganismo difícil de diferenciar e recentemente implicado em infecções respiratórias graves em pacientes com fibrose cística (CAMPBELL III, et al, 1995).

3.4.3.2 Fatores de virulência

As cepas de *B. cepacia* produzem uma variedade de fatores de virulência que incluem lipase, protease e hemolisinas, mas não está claro como esses fatores estão relacionados com a patogênese da bactéria na fibrose cística (BARTH, A. L.; PITT, T. L., 1998)

Embora os fatores que permitem a colonização pulmonar sejam pouco entendidos, as proteínas de membrana externa associadas aos pili na superfície da bactéria têm um papel importante na adesão de *B. cepacia* ao trato respiratório.

Essa bactéria é capaz de invadir o epitélio aéreo e pode também causar bacteremia disseminada. É intrinsecamente resistente a vários antibióticos pela presença de porinas, e a existência de anticorpos específicos anti-porinas está correlacionada a um bom prognóstico (LYCZAK, J. B., et al, 2002). Essa resistência está relacionada também à permeabilidade seletiva da parede celular, alteração da célula-alvo e à inativação enzimática de antibióticos (MILLER, M. B.; GILLIGAN, P. H., 2003).

3.4.3.3 Transmissão e vias de aquisição

Bactérias do complexo *B. cepacia* são encontradas no solo e nas plantas. Espécies diferentes do complexo aparentemente ocupam vários nichos no ambiente

natural, mas são necessários mais estudos para esclarecer esse ponto. O risco da presença dessas cepas no ambiente natural permanece incerto (SAIMAN, L.; SIEGEL, J., 2004).

Acredita-se que a infecção por *B. cepacia* dissemina-se por contato direto paciente-paciente, por transmissão nosocomial ou por aquisição a partir do meio ambiente (CHEN, J. S., et al, 2001), ou seja, é transmissível tanto dentro como fora do ambiente hospitalar (LYCZAK, J. B., et al, 2002).

3.4.4 *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae é a terceira bactéria mais isolada do trato respiratório de pacientes com FC e normalmente pode não ser recuperada em pacientes adultos (MILLER, M. B.; GILLIGAN, P. H., 2003). Essa bactéria é primariamente, mas não exclusivamente, encontrada em crianças com FC. (GILLIGAN, P.H., 1991)

3.4.4.1 Impacto clínico

Haemophilus influenzae não é persistente por longos períodos nos pulmões. Embora sua colonização tenha sido relacionada com exacerbações pulmonares, não há evidência de que possa ter ocorrido uma infecção primária com declínio pulmonar (GILLIGAN, P.H., 1991).

O isolamento dessa espécie das secreções de pacientes com FC é desafiador, especialmente em pacientes coinfectados com *P. aeruginosa*. Três estratégias podem ser propostas para o isolamento do *H. influenzae*. A utilização de ágar chocolate suplementado com bacitracina, incubação das placas anaerobicamente para diminuir o

crescimento de *P. aeruginosa* ou o uso de técnica de cultura quantitativa. (MILLER, M. B.; GILLIGAN, P. H., 2003)

3.4.4.2 Vias de aquisição

Muitas vezes *H. influenzae* começa colonizando primariamente o trato respiratório superior. Dados relacionados ao potencial patogênico dessa bactéria, virtualmente não existem, mesmo assim muitos clínicos consideram a possibilidade desse microrganismo colonizar os pulmões, de maneira significativa o bastante para justificar a terapia (LYCZAK, J. B., et al, 2002).

3.4.5 *Streptococcus pneumoniae*

É um microrganismo ocasionalmente isolado de culturas de pacientes com fibrose cística e não persiste muito tempo na doença pulmonar. Normalmente ocorre secundariamente aos principais microrganismos (GILLIGAN, P. H., 1991).

3.4.6 *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans*

Stenotrophomonas maltophilia e *Achromobacter xylosoxidans* estão sendo vistos com maior frequência, principalmente na população adulta. O papel de qualquer desses agentes na doença pulmonar, porém, não foi ainda determinado (MILLER, M. B.; GILLIGAN, P. H., 2003).

3.4.6.1 Epidemiologia e impacto clínico

Ambas as bactérias podem ser patógenos emergentes em pacientes com FC, por isso é crítico estabelecer a transmissibilidade desses microrganismos.

A prevalência desses microrganismos tem sido frequentemente relatada, porém com diferenças entre os centros de tratamento de pacientes com FC.

A patogenicidade de *S. maltophilia* e *A. xylosoxidans* em FC não foi ainda estabelecida, embora a associação destes microrganismos com exacerbações pulmonares já tenha sido relatada (SAIMAN, L.; SIEGEL, J., 2004).

Em alguns casos, os médicos estão interessados em saber se estes microrganismos estão presentes para erradicá-los através de terapia antibiótica. Testes de suscetibilidade a antimicrobianos devem ser realizados pelo CIM (concentração inibitória mínima) porque várias falhas no método de disco-difusão já foram relatadas, considerando que estes microrganismos são normalmente resistentes a uma ampla variedade de antimicrobianos (MILLER, M. B.; GILLIGAN, P. H., 2003).

A epidemiologia, no caso destas bactérias, já foi estudada para correlacionar com sua transmissibilidade. Normalmente pacientes com FC do mesmo centro de tratamento podem carregar o mesmo clone tanto de *S. maltophilia* como de *A. xylosoxidans* (SAIMAN, L.; SIEGEL, J., 2004).

3.4.6.2 Transmissão

Estudos epidemiológicos foram realizados para observar a transmissibilidade desses patógenos potencialmente transmissíveis. Concluiu-se que a transmissão de *S. maltophilia* pode ocorrer principalmente entre pacientes com FC através do meio ambiente, dos centros de tratamento, e até mesmo nos lares de pacientes colonizados

e não colonizados foram identificadas fontes de transmissão. Para *A. xylosoxidans* a fonte de transmissão ainda não foi identificada, mas os pacientes avaliados tinham sido hospitalizados ao mesmo tempo (SAIMAN, L.; SIEGEL, J., 2004).

3.4.7 Micobactérias

O papel das micobactérias em doença pulmonar crônica não foi profundamente estudado. As micobactérias atípicas são as mais encontradas. Como a expectativa de vida dos pacientes com fibrose cística tem aumentado, a colonização por micobactérias atípicas pode se tornar proeminente e em alguns casos poderá causar deterioração pulmonar. (GILLIGAN, P. H., 1991)

3.4.7.1 Impacto clínico e cultivo

Através dos últimos 15 anos tem ocorrido um aumento nos relatos de pacientes com FC infectados ou colonizados com micobactérias. Na realidade, o impacto clínico desses microrganismos permanece incerto desde que alguns investigadores reportaram não haver conseqüências clínicas nos pacientes com cultura positiva para micobactérias atípicas. Outros relatos, porém, indicaram que pacientes com cultura positiva e doença pulmonar responderam à terapia antibiótica e que granulomas foram observados na biópsia ou autópsia de pacientes com doença clínica.

Os fatores de risco para a colonização e infecção por esses patógenos incluem o uso de antibióticos intravenosos e nebulizados (SAIMAN, L.; SIEGEL, J., 2004).

O cultivo de micobactérias do escarro de pacientes com FC pode ser difícil. Os pacientes com FC colonizados ou infectados por micobactérias estão também infectados com *P. aeruginosa*. Esta bactéria pode sobreviver a procedimentos de

descontaminação utilizados para eliminar a microbiota bacteriana contaminante nas culturas para micobactérias no trato respiratório. Por esse motivo, elas podem crescer nas culturas para micobactérias bem como degradar e liquefazer o ágar Löwenstein-Jensen, fazendo com que o isolamento das micobactérias se torne inviável. Como resultado, a importância da observação da microscopia direta das secreções respiratórias para bacilos álcool-ácido resistentes deve ser enfatizada. Embora as micobactérias aparentemente têm um papel menor na doença pulmonar de pacientes com FC, elas deveriam ser consideradas no diagnóstico diferencial em pacientes com FC (GILLIGAN, P. H., 1991).

Para assegurar a recuperação de micobactérias atípicas dos pacientes com FC, são necessárias condições de descontaminação devido à presença de *P. aeruginosa* em culturas para micobactérias. O tratamento seqüencial de amostras respiratórias com N-acetilcisteína e NaOH seguido por tratamento com ácido oxálico mostrou um aumento significativo na média de recuperação de micobactérias atípicas pela redução do crescimento de *P. aeruginosa* (WHITTIER, S., et al., 1997; MILLER, M. B.; GILLIGAN, P. H., 2003).

3.4.7.2 Transmissão

Poucos estudos utilizando biologia molecular foram realizados para micobactérias atípicas a fim de se examinar a possibilidade de transmissão paciente-paciente entre os pacientes com FC. Até o momento, cepas compartilhadas não foram consistentemente demonstradas nesses estudos.

Pacientes com FC podem apresentar risco de colonização ou infecção por micobactérias. A maioria dessas bactérias são micobactérias atípicas, mas *M.tuberculosis* pode também infectar esses pacientes. Para prevenir a disseminação de

M. tuberculosis e direcionar o tratamento apropriado, os bacilos álcool-ácido resistentes devem ser identificados em nível de espécie e os pacientes devem ser isolados até que a possibilidade de apresentarem *M. tuberculosis* seja descartada (SAIMAN, L.; SIEGEL, J., 2004).

3.4.8 Fungos

O principal agente fúngico responsável pela infecção pulmonar em pacientes com fibrose cística é *Aspergillus* spp. Os fungos filamentosos são freqüentemente recuperados de amostras respiratórias de pacientes com FC, especialmente com o aumento do uso de ágar seletivo para *B. cepacia* que auxilia no crescimento de fungos. Somente *Aspergillus* spp. tem sido reconhecido sendo associado aos sintomas pulmonares em pacientes com FC. (MILLER, M. B.; GILLIGAN, P. H., 2003)

3.4.8.1 Impacto clínico

Especificamente este microrganismo causa aspergilose broncopulmonar alérgica (ABA) em pacientes com FC. A aspergilose e o aspergiloma invasivo não são comuns nessa população. Esse agente também aparece em exacerbações pulmonares e geralmente o prognóstico não é muito bom (GILLIGAN, P.H., 1991). O diagnóstico dessa entidade é baseado mais no critério clínico do que na recuperação do microrganismo. Apesar disso, a documentação da presença de fungos filamentosos nessa população tem valor limitado (MILLER, M. B.; GILLIGAN, P. H., 2003).

3.4.8.2 Transmissão

Infecções por *Aspergillus* spp. são adquiridas por exposição ambiental e não podem ser totalmente prevenidas. Altas concentrações de esporos podem se tornar aerossóis durante construções ou em jardinagem, ao cortar grama. Vazamentos de água também podem ser fonte de *Aspergillus* spp. no ambiente. Cuidados corretos devem ser tomados com a exposição de pacientes vulneráveis, principalmente aqueles que realizaram transplantes de órgãos sólidos. (SAIMAN, L.; SIEGEL, J., 2004).

3.5 CULTURA E QUANTIFICAÇÃO

Os pacientes mais jovens com fibrose cística normalmente não expectoram escarro derivado de secreções do trato respiratório inferior, razão pela qual a cultura de orofaringe do trato respiratório superior é normalmente realizada para detectar os patógenos. Na realidade, essas culturas detectam microrganismos, incluindo os potenciais patógenos, presentes na orofaringe, não necessariamente nos pulmões. Vários estudos mostraram que pode haver diferenças relacionadas com a detecção dos patógenos da fibrose cística no trato respiratório inferior, quando comparados com as culturas do trato inferior obtidas de lavado bronco-alveolar, particularmente em pacientes jovens. Ramsey e colaboradores (1991), relataram que, em pacientes que não expectoravam em ótimas condições respiratórias, houve um alto valor preditivo positivo de cultura de orofaringe, para a presença de *P. aeruginosa* e *S. aureus* no trato inferior, determinada por cultura de lavado bronco-alveolar e um alto valor preditivo negativo, sendo que 46% dos pacientes desse estudo tinham *P. aeruginosa* no lavado e uma cultura negativa de orofaringe.

As bactérias não estão uniformemente distribuídas no escarro, portanto, uma correta identificação dos microrganismos predominantes depende da amostra da área representativa da infecção e sem contaminação por bactérias da orofaringe. Apesar da baixa correlação entre os microrganismos predominantes isolados em culturas de rotina e o número de cada espécie isolada em cultura quantitativa, essa técnica foi mais sensível no isolamento de estreptococos ou *Haemophilus* spp. quando estava presente *P. aeruginosa* (WONG, K., et al., 1984). É possível correlacionar também os sintomas de exacerbação pulmonar aos microrganismos que significativamente cresceram na cultura quantitativa para ajudar na terapia antimicrobiana.

3.6 SOROLOGIA PARA PSEUDOMONAS

Geralmente os níveis de anticorpos anti-Pseudomonas estão normais quando a primeira cultura positiva para *P. aeruginosa* ocorre. Nestes pacientes a erradicação da bactéria com tratamento apropriado é facilmente atingida. O monitoramento dos níveis de anticorpos anti-pseudomonas, em parte, compensa a baixa sensibilidade das culturas para *P. aeruginosa* em pacientes que não produzem muita secreção. Em pacientes com infecção crônica por esse agente os níveis de anticorpos estão aumentados e esses níveis correlacionam com a gravidade do envolvimento pulmonar. Um nível de anticorpos aumentado indica um elevado envolvimento tecidual e um aumento da resposta imunológica. O tratamento regular com antibióticos via endovenosa está associado com níveis estáveis ou decrescentes de anticorpos. Certamente um rápido aumento nesses níveis exige uma antibioticoterapia mais agressiva. Por essa razão, é importante medir os anticorpos anti-Pseudomonas no início da infecção por *P. aeruginosa* e no início do tratamento em exacerbações

pulmonares de pacientes cronicamente infectados ou colonizados (*Cystic Fibrosis Trust*, 2001).

No entanto é paradoxal que os pacientes de FC com altos títulos de anticorpos, que supostamente protegem contra infecção, são aqueles que estão cronicamente colonizados por *P. aeruginosa*. Está claro então que o elevado título de anticorpos anti-pseudomonas, que deveriam proteger contra a septicemia, são insuficientes para eliminar a bactéria do pulmão dos pacientes com FC (BARTH, A. L.; PITT, T. L., 1998).

3.7 TRATAMENTO

Apesar dos avanços no conhecimento da doença, ainda não existe tratamento específico para a FC. Devido ao seu caráter multissistêmico e crônico, o tratamento deve ser realizado em centros de referência com equipe multidisciplinar. Pacientes com boa adesão ao tratamento apresentam uma sobrevida média que vem aumentando, passando de 2 anos, em 1950, para 30-40 anos atualmente. Deve-se estabelecer um programa de tratamento contínuo, visando à profilaxia das infecções e das complicações. Deve ser iniciado o mais precocemente possível e ser individualizado levando-se em conta a gravidade e os órgãos acometidos. O tratamento precoce retarda a progressão das lesões pulmonares, melhora o prognóstico e aumenta a sobrevida.

Dentre os principais objetivos do tratamento da FC estão: a educação continuada do paciente e dos familiares em relação à doença; a profilaxia das infecções com um programa vacinal completo; a detecção precoce e o controle da infecção pulmonar; a fisioterapia respiratória e melhora da obstrução brônquica; a correção da insuficiência pancreática através da administração de enzimas; o apoio nutricional, com orientações em relação à dieta e suplementação de vitaminas; o monitoramento da progressão da

doença; o monitoramento de complicações; o aconselhamento genético familiar; o apoio psicológico para o paciente e seus familiares; o acesso irrestrito às medicações; e manter os pacientes e familiares informados sobre os avanços nos conhecimentos da FC, preservando uma atitude otimista em relação à doença (RIBEIRO J. D., et al, 2002).

3.7.1 Antibioticoterapia

O tratamento com antibióticos é provavelmente o fator único mais importante responsável pela melhora dos pacientes com FC, tanto em termos de sobrevida como em qualidade de vida. Os antibióticos são muito efetivos na redução da infecção das vias aéreas preservando a saúde pulmonar (ORENSTEIN, D. M., 1996).

A antibioticoterapia pode ser realizada de várias maneiras: através da antibioticoterapia de demanda, quando o uso de antibióticos ocorre somente quando houver sinais de exacerbações agudas da doença pulmonar; a antibioticoterapia profilática, quando há uso de antibióticos antes que *P. aeruginosa* seja detectada, para prevenir colonização e infecção; ou a antibioticoterapia de manutenção, quando há uso de antibióticos por tempo prolongado, que pode ser contínua ou intermitentemente, mesmo se os sintomas forem discretos e mesmo se os sinais de exacerbação pulmonar aguda estiverem ausentes (DÖRING, G, et al, 2000).

O método mais comum de utilizar drogas é por via oral. Alguns medicamentos podem ser administrados via endovenosa (EV) ou intramuscular (IM) e outros, ainda, podem ser administrados por via inalatória (ORENSTEIN, D. M., 1996).

Antibióticos orais são normalmente utilizados quando a infecção é causada por *S. aureus* ou *Haemophilus* sp. A terapia oral pode também ajudar nas infecções por *Pseudomonas*, mas freqüentemente após cultura de orofaringe ou escarro, observa-se que de fato, esses antibióticos não são efetivos. Se este for o caso, deve haver

tratamento via inalatória ou via intravenosa. Comparando com a terapia oral, a via inalatória e a via intravenosa são mais potentes chegando com maior eficácia ao local da infecção.

Do grupo dos betalactâmicos, penicilina e ampicilina podem ser administradas via oral, EV ou IM e amoxicilina por via oral. Sulfametoxazol-trimetoprim, eficaz contra *Haemophilus* sp., é administrado via oral. Os aminoglicosídeos, incluindo tobramicina, amicacina e gentamicina são quase sempre administradas por via inalatória ou ainda podem ser utilizados por via EV ou IM, uma vez que estes antibióticos não são bem distribuídos na corrente circulatória quando utilizados por via oral. Cloranfenicol, normalmente muito eficaz contra *Haemophilus* sp., alguns *Staphylococcus* sp. e anaeróbios, pode ser administrado via oral ou EV. Do grupo das cefalosporinas, cefalexina e cefaclor são administradas somente por via oral e ceftazidima e cefepime somente EV ou IM. As quinolonas, drogas geralmente utilizadas contra *P. aeruginosa*, são utilizadas por via oral. Já os carbapenêmicos e aztreonam podem ser utilizados somente via EV (ORENSTEIN, D. M., 1996).

Os antibióticos administrados por via inalatória em uso pelos pacientes neste estudo foram tobramicina, amicacina, gentamicina e colistin (polimixina E).

Pelos estudos bacteriológicos das secreções pulmonares, *P. aeruginosa* (cepas mucóides e não-mucóides) e *S. aureus* são responsáveis por 60 a 70% das reagudizações e a terapêutica inicial deve ser dirigida contra esses dois agentes, enquanto são aguardados os resultados das culturas (ROZOV, T. 1999).

Amicacina, tobramicina e gentamicina são as drogas freqüentemente usadas, segundo a sensibilidade dos microrganismos. Recentemente, novas drogas anti-estafilocócicas, vancomicina e teicoplanina, e as anti-pseudomonas, como meropenem, têm sido empregadas quando há resistência ou falta de resposta clínica (ROZOV, T. 1999).

3.7.2 Terapia de reposição enzimática

Com a obstrução dos dutos pancreáticos há o impedimento da chegada das enzimas pancreáticas até o duodeno. Tão logo fique caracterizada a insuficiência pancreática, deve-se iniciar uma terapia de reposição enzimática, evitando assim a instalação ou agravamento da desnutrição (RIBEIRO J. D., et al, 2002).

Os preparados orais de enzimas administrados antes das refeições conseguem suprir a falta enzimática, controlando satisfatoriamente a má digestão e, por consequência, a má absorção (ROZOV, T., 1999).

3.7.3 Fisioterapia

Apesar da literatura sugerir que as técnicas de fisioterapia possam ser benéficas em auxiliar a depuração mucociliar, ainda não existem evidências científicas que suportem a hipótese de que estas técnicas, com o propósito de aumentar o *clearance* das secreções respiratórias, tenham algum benefício em pacientes fibrocísticos. As técnicas fisioterápicas devem ser utilizadas, porém, para tentar demonstrar a eficácia e a eficiência das técnicas de fisioterapia quanto à drenagem de secreções pulmonares (RIBEIRO J. D., et al, 2002).

3.8 COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO PULMONAR

Pseudomonas aeruginosa tem sido encontrada em mais de 80% dos adolescentes com FC e o significado da sua presença nas vias aéreas foi definido através de um consenso europeu (DÖRING, G., et al, 2000) apresentado a seguir:

Colonização pulmonar aguda – presença de *P. aeruginosa* na árvore brônquica, sem evidências diretas (inflamação, febre, etc.) ou indiretas (resposta de anticorpos específicos) de infecção e dano tissular.

Colonização pulmonar crônica – presença de *P. aeruginosa* na árvore brônquica por 6 meses, no mínimo, baseado em pelo menos três culturas positivas, com ao menos um mês de diferença entre elas, sem sinais diretos (inflamação, febre, etc.) e indiretos (resposta de anticorpos específicos) de infecção e dano tissular.

Infecção pulmonar aguda – presença de *P. aeruginosa* na árvore brônquica, com sinais diretos (inflamação, febre, etc.) e indiretos (resposta de anticorpos específicos) de infecção e dano tissular.

Infecção pulmonar crônica – Presença de *P. aeruginosa* na árvore brônquica, por 6 meses, no mínimo, identificada em pelo menos três culturas positivas, com ao menos um mês de diferença entre elas com sinais diretos (inflamação, febre, etc.) e indiretos (resposta de anticorpos específicos) de infecção e dano tissular. A infecção pulmonar crônica também pode ser diagnosticada com base na resposta positiva de anticorpos nos últimos dois exames para pacientes que não expectoram e que apresentam culturas negativas.

Uma vez estabelecida nas vias aéreas, a infecção por pseudomonas não pode ser erradicada pelo uso de antibióticos que apenas reduzem o número de colônias dessas bactérias. Os antibióticos na FC podem ser administrados por via oral, intravenosa ou inalatória. Seu uso é direcionado sob a forma de demanda, profilaxia ou de manutenção e baseia-se nas definições de colonização e infecção citadas acima, ou quando existirem exacerbações das manifestações pulmonares.

3.9 FUNÇÃO PULMONAR

A função pulmonar dos pacientes com FC é medida através da espirometria. Funcionalmente observa-se instabilidade de vias centrais e obstrução de vias aéreas periféricas. Essa obstrução de pequenas vias determina aprisionamento de ar. Evolutivamente, a constante supuração, as bronquiectasias e a fibrose progressiva determinam um processo restritivo no pulmão destruído, ainda que permaneça o aprisionamento de ar. A função pulmonar e a limitação ao exercício são mais pronunciadas em meninas do que em meninos do mesmo grupo etário (ROZOV, T., 1999).

As infecções respiratórias de repetição ou exacerbações pulmonares são a maior preocupação nos pacientes com FC. É o ciclo da infecção e da inflamação que danifica os pulmões e esse dano causa um declínio no VEF₁ (volume expiratório forçado no primeiro segundo). Quando os pulmões estão prejudicados, as exacerbações pulmonares ocorrem com maior frequência.

Os 10 sinais e sintomas que indicam a exacerbação pulmonar na fibrose cística (RIBEIRO, J. D., et al, 2002) são: aumento da tosse, aumento da produção de escarro, febre, anorexia e perda de peso, absenteísmo na escola ou no trabalho, diminuição da tolerância aos exercícios, diminuição na saturação de oxigênio, novos achados na ausculta pulmonar, novos achados à radiografia de tórax e redução de mais de 10% no VEF₁.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho recebeu a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná segundo documento em Anexo.

4.1 AMOSTRAS

Durante o período de agosto de 2003 a outubro de 2004, foram obtidas 144 amostras de 38 pacientes acompanhados no ambulatório especial de Fibrose Cística do HC da UFPR. O material incluiu 90 amostras de escarro (induzido ou não) e 54 amostras de orofaringe, em pacientes com dificuldade de expectorar espontaneamente.

4.2 COLETA

Em pacientes adultos, as amostras foram coletadas em frasco estéril de boca larga, com um volume de cerca de 3 a 5 ml de escarro obtido por esforço de tosse, com ou sem nebulização utilizando solução de cloreto de sódio à concentração de 4,5%. Em pacientes pediátricos e com dificuldade de expectorar, foram coletados *swabs* de orofaringe com quantidade abundante de material que foram acondicionados em tubo estéril seco.

4.3 TRANSPORTE

As amostras foram enviadas ao laboratório de bacteriologia para processamento imediato.

4.4 PERIODICIDADE DAS COLETAS

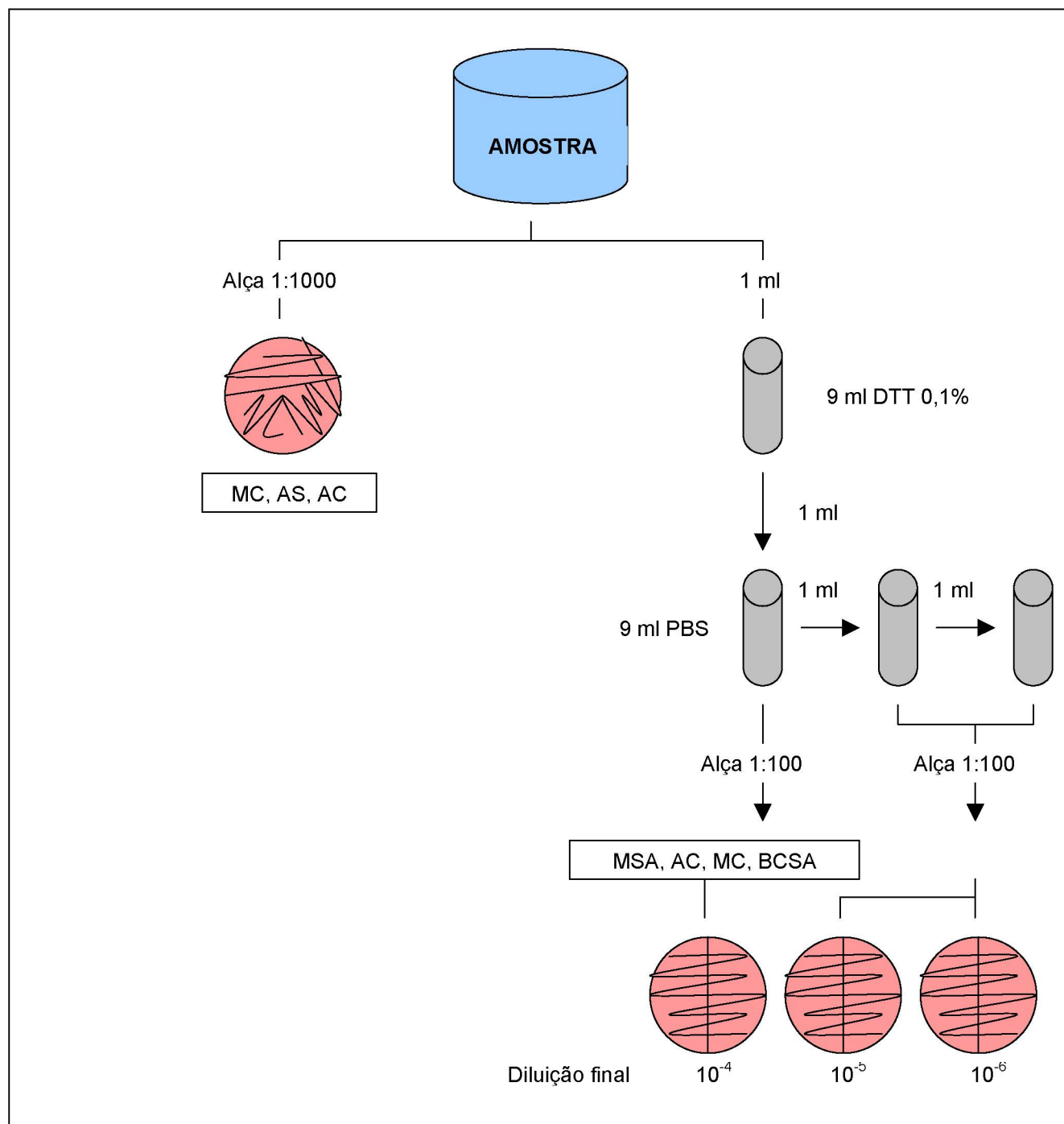
As amostras foram coletadas com periodicidade de 2 a 4 meses, dependendo da frequência de consultas dos pacientes no ambulatório de FC.

4.5 CULTURA QUANTITATIVA

As amostras de escarro sem tratamento prévio foram submetidas ao cultivo bacteriano inoculando primeiramente com alça calibrada 1:1000 em ágar sangue de carneiro, ágar chocolate suplementado e ágar Mac Conkey em semeadura por esgotamento. Um ml de escarro foi fluidificado com 9 ml de ditioneitol 0,1% e após agitação em vortex, 1 ml da amostra fluidificada foi diluído seriadamente em 9 ml tampão de PBS até a obtenção de uma diluição de 10^{-4} . Após deixar os tubos em repouso por alguns minutos, as diluições obtidas foram semeadas com alça calibrada 1:100 em placas de ágar chocolate suplementado, ágar manitol salgado, ágar Mac Conkey e ágar seletivo para *Burkholderia cepacia* (BCSA), de forma a obter diluições finais de 10^{-4} ; 10^{-5} e 10^{-6} . As placas foram incubadas à temperatura de 36,5°C a 37°C por 24 a 48 horas e as placas de Ágar BCSA à temperatura de 32°C a 33°C por até 5 dias (WONG, K., et al., 1983).

O esquema a seguir mostra o procedimento realizado com as amostras para o processamento da cultura quantitativa.

FIGURA 2 - DIAGRAMA DA TÉCNICA DE CULTURA QUANTITATIVA PARA GERMES FACULTATIVOS



LEGENDA: NaOH – Hidróxido de Sódio; MC – ágar Mac Conkey; AS – ágar Sangue; AC – ágar chocolate; MSA – ágar manitol salgado; BCSA – ágar seletivo para *Burkholderia cepacia*; DTT – ditiotreitól; PBS – tampão fosfato.

4.6 ARMAZENAMENTO DE MICRORGANISMOS

As bactérias isoladas das culturas das amostras de escarro e orofaringe foram armazenadas em caldo TSB com 10% de glicerol em freezer a -80°C para posterior análise.

4.7 PESQUISA DE MICOBACTÉRIAS

Os métodos de descontaminação do escarro utilizados neste trabalho para isolamento de bacilos álcool-ácido resistentes foram em um primeiro momento o de Petroff e posteriormente o do Ditiotreitól (DTT) com hidróxido de sódio (NaOH) e ácido oxálico (BANGE, F-C.; KIRSCHNER, P.; BÖTTGER, E., 1999).

4.7.1 Método de Petroff

A aproximadamente 1 ml de escarro adicionou-se igual volume de hidróxido de sódio com vermelho de fenol (vermelho de fenol 0,004% em NaOH a 4%) e aguardou-se 20 minutos. A mistura foi então centrifugada a 3000 rpm, durante 15 minutos. Após assentado o aerossol, eliminou-se o sobrenadante cuidadosamente em frasco de boca estreita, contendo fenol a 5%. O sedimento foi neutralizado com ácido clorídrico (HCl) 2N em presença de vermelho de fenol, gota a gota, até atingir a cor âmbar (pH 6,5 a 7,2). A partir daí semeou-se a amostra homogeneizada em 2 tubos de Löwenstein-Jensen (3 gotas em cada tubo), que foram incubados a 37 °C inclinados e com a tampa ligeiramente aberta de maneira que o líquido banhasse a superfície do meio e pudesse evaporar. No dia seguinte à incubação, os tubos foram fechados por completo para aguardar a incubação por 60 dias. Inspeccionou-se as culturas semanalmente para

avaliar o crescimento de colônias características de micobactérias. O crescimento de qualquer colônia suspeita foi confirmado pela coloração de Ziehl-Neelsen.

4.7.2 Método do Ditiotreitól (DTT) com NaOH e Ácido Oxálico

Neste trabalho utilizou-se o método de Bange, 1999, modificado, que utiliza N-acetil-L-cisteína e ácido oxálico para a descontaminação do escarro. Utilizou-se uma adaptação da técnica na qual foi substituído o N-acetil-L-cisteína por um outro fluidificante, o ditiotreitól 0,1%, já utilizado na técnica da cultura quantitativa com a finalidade de fluidificar a amostra.

As amostras, primeiramente combinadas com um volume igual de uma solução a 0,1% de ditiotreitól (DTT) e 2% de NaOH, foram agitadas em vortex e deixadas por pelo menos 15 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se um volume igual de ácido oxálico 5% à mistura. Esta solução foi então centrifugada e lavada com tampão fosfato. Neutralizou-se o sedimento pela adição de NaOH até atingir pH 7, sendo semeado em 2 tubos de Löwenstein-Jensen, 3 gotas em cada tubo (BANGE, F-C.; KIRSCHNER, P.; BÖTTGER, E., 1999).

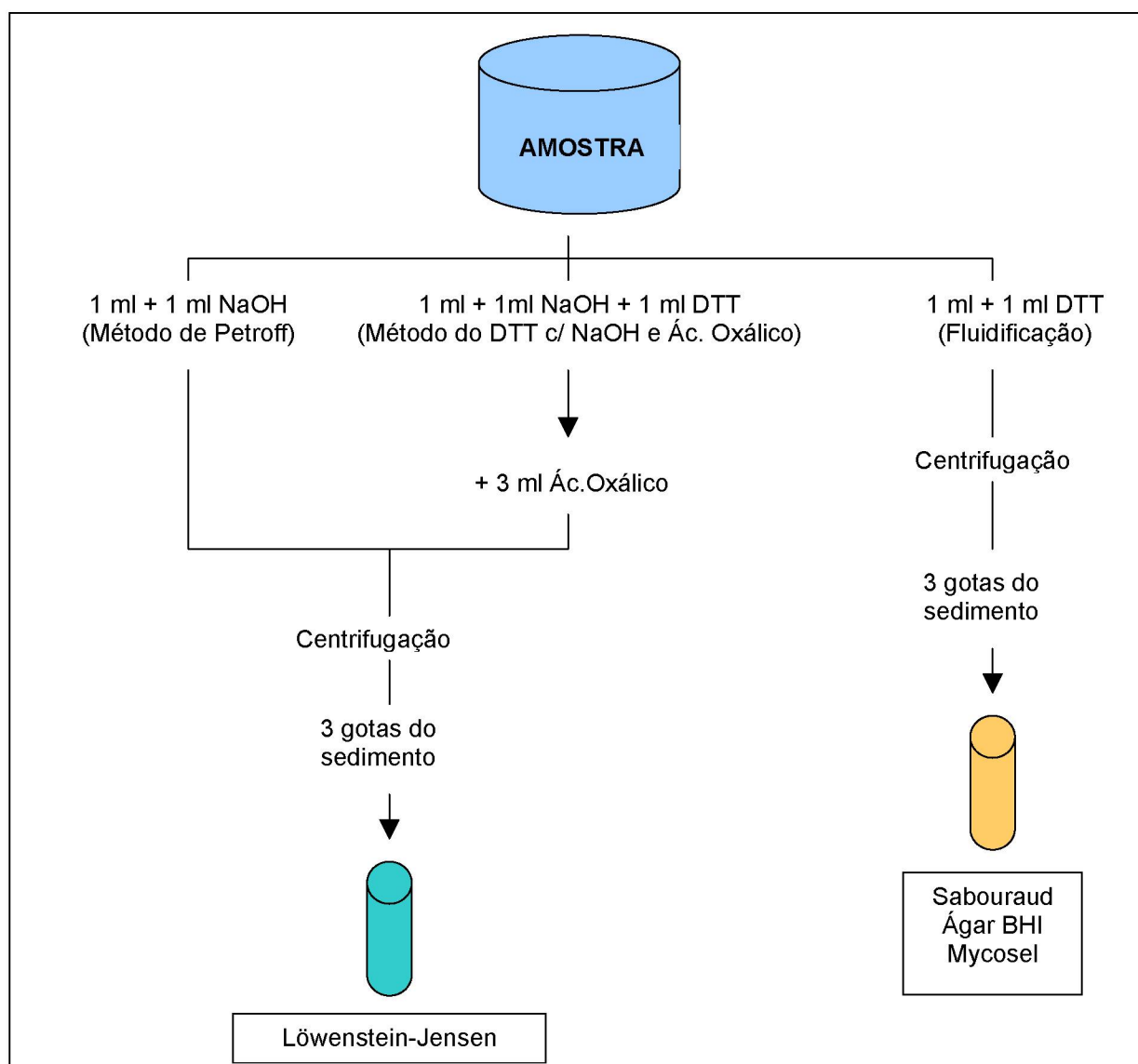
Os tubos foram incubados a 37°C inclinados e com a tampa ligeiramente aberta de maneira que o líquido banhasse a superfície do meio e pudesse evaporar. No dia seguinte à incubação, os tubos foram fechados completamente e mantidos na estufa por 60 dias. A cada semana revisaram-se os tubos para avaliar o crescimento de colônias características de micobactérias. O crescimento de qualquer colônia suspeita foi confirmado pela coloração de Ziehl-Neelsen.

4.8 PESQUISA DE FUNGOS

Para a pesquisa de fungos realizou-se a fluidificação do escarro com 1 ml de dithiotreitol a 0,1% e, após a centrifugação, foi semeada uma alíquota do sedimento desta amostra em ágar Sabouraud, ágar BHI e ágar Mycosel que contém antibióticos para inibir o crescimento de bactérias.

A Figura 3 mostra o diagrama da técnica utilizada para cultura de fungos e de micobactérias.

FIGURA 3 - DIAGRAMA DA TÉCNICA DE CULTURA PARA FUNGOS E MICOBACTÉRIAS



LEGENDA: NaOH – hidróxido de sódio; DTT – ditioneitol; BHI – infusão de cérebro e coração.

4.9 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA PRELIMINAR

Cada microrganismo foi caracterizado fenotipicamente através de suas respectivas provas bioquímicas que são utilizadas rotineiramente no laboratório de

bacteriologia do Hospital de Clínicas da UFPR, de acordo com o *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (1992), da Sociedade Americana de Microbiologia e Konemann (1997).

4.10 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

4.10.1 Caracterização fenotípica das amostras de *Pseudomonas aeruginosa*

As amostras identificadas na rotina do laboratório de Bacteriologia foram confirmadas pelo conjunto de provas específicas para confirmação das espécies de *Pseudomonas* representadas na Tabela 2 a seguir.

TABELA 2 - TESTES UTILIZADOS PARA CONFIRMAÇÃO DE IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DAS AMOSTRAS DE *P. aeruginosa*

TESTE		<i>P. aeruginosa</i>
Oxidase		+
Crescimento em:	MacConkey	+
	Cetrimide 33°C	+
	Cetrimide 42°C	+
Redução do nitrato		+
Gás do nitrato		+
Piocianina		+ / -
Hidrólise da:	Gelatina	+
	Acetamida	+
Ácido de**:	Glicose	+

LEGENDA: ** Realizado em meio Oxidativo-Fermentativo basal (OF basal) com 1% de glicose.

FONTE: Adaptado de KISKA, D.L.; GILLIGAN, P. H. *Pseudomonas*. In: MURRAY, P. R., et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 8 ed. Washington: ASM press. 2003. 1212 p.

Para classificar os isolados mucóides e não-mucóides, além da observação da característica morfológica colonial, foi realizada a extração da piocianina, que não está presente na grande maioria das cepas mucóides.

4.10.2 Caracterização fenotípica das amostras do complexo *Burkholderia cepacia*

A identificação dos isolados do complexo *B. cepacia* foi realizada pela combinação de isolamento meio seletivo e análise bioquímica convencional.

O ágar seletivo para *Burkholderia cepacia* (BCSA) isolou com qualidade essas bactérias (crescimento em 72 horas de incubação) inibindo o crescimento de outros microrganismos.

Foram realizados testes fenotípicos, descritos na Tabela 3, que permitiram a separação de *B. gladioli*, espécies do gênero *Pandoraea*, *R. pickettii*, *A. xylosoxidans* e *S. maltophilia* do complexo *B. cepacia* e alguns membros do complexo foram identificados em variantes genômicas baseadas nos fenótipos (COENYE, T., et al., 2001).

4.10.3 Identificação das amostras de *Staphylococcus aureus*

Realizou-se a identificação de 81 isolados de *S. aureus* com as provas de catalase e coagulase. A prova da coagulase foi realizada a partir de 24 horas de incubação das cepas de *S. aureus* em caldo BHI (caldo de infusão de cérebro e coração) do qual pipetou-se 100 µL em 2 mL de plasma de coelho já ressuspenso. A prova da catalase foi realizada a partir de contato de uma colônia isolada com uma gota de água oxigenada 10 volumes sobre a lâmina de vidro.

As amostras que cresceram no ágar manitol salgado, ou seja, as que apresentaram crescimento em meio contendo 6,5% de NaCl, e oxidaram o manitol, foram confirmadas pela prova da catalase. Considerou-se a prova da catalase positiva quando se observou a formação de bolhas durante o contato da colônia com água oxigenada 10 volumes. As amostras positivas foram submetidas à prova da coagulase. Esta prova foi considerada positiva quando se observou a formação de coágulo do plasma de coelho após uma primeira leitura em 6 horas e com segunda leitura em 24 horas de incubação em estufa a 37°C.

Utilizou-se meio sólido distribuído em tubos com camada alta para observação da fermentação do manitol.

Para triagem do gen *mecA* utilizou-se ágar Mueller-Hinton com concentração de 6% de oxacilina e 4% de NaCl. Esta prova foi realizada a partir de uma suspensão de bactérias da qual foi retirada uma alíquota com a ajuda de um *swab* e colocada sobre o meio em forma de uma gota. Para o controle de qualidade utilizou-se a cepa de *S. aureus* ATCC 25923.

4.11 TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

Para o teste de susceptibilidade a antimicrobianos foram utilizados os antibióticos apropriados para cada espécie isolada pelo método de Kirby-Bauer conforme o *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*, 2004.

Inicialmente confeccionou-se uma suspensão do microrganismo a ser testado em salina padronizada de acordo com o tubo 0,5 da escala de Mac Farland. Após preparação da suspensão, um *swab* foi embebido nesta e, depois de se retirar o excesso de líquido nas paredes do próprio tubo, foi semeado em uma placa de ágar Mueller-Hinton em três sentidos. Os discos de papel impregnados com concentrações fixas conhecidas de antibióticos foram posicionados conforme o grupo de organismo em identificação. As placas de ágar Mueller-Hinton já inoculadas e com os discos de antibióticos foram incubadas por 18 a 24 horas e a leitura do halo de inibição foi realizada com o auxílio de uma régua específica (halômetro) e segundo a tabela de interpretação do NCCLS, 2004.

Os antibióticos testados para *P. aeruginosa* foram amicacina, aztreonam, ciprofloxacina, cefepime, gentamicina, imipenem, meropenem, polimixina B e sulfametoxazol-trimetoprim. Para *S. aureus* foram testados ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, oxacilina, penicilina, sulfametoxazol/trimetoprim e vancomicina. Para bactérias do complexo *B. cepacia* foram testados ceftazidima, meropenem e sulfametoxazol/trimetoprim.

4.12 TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

O teste de concentração inibitória mínima foi realizado por diluição em ágar para determinar a CIM e para conferir se os dados obtidos pelo método de disco-difusão de

P. aeruginosa e *S. aureus* se confirmaram. O método consiste em testar diferentes concentrações de antibióticos incorporados no meio de cultura em placa frente a concentrações fixas do microrganismo (NCCLS, 2004).

Foram realizadas CIM de 83 isolados de *P. aeruginosa*, sendo 39 mucóides e 44 não mucóides, e de 68 isolados de *S. aureus* para verificar a evolução da resistência e.

As cepas de controle de qualidade utilizadas foram *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 para controle de *P. aeruginosa* e a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 para controle de qualidade de *S. aureus*.

4.12.1 Variações das concentrações testadas

A concentração padrão dos antimicrobianos pode variar de acordo com a droga, com o organismo a ser testado e com o sítio da infecção. Os padrões incluíram concentrações que permitiram a determinação de categorias interpretativas (por exemplo, susceptível, intermediário e resistente) e também padrões que incluíam as CIMs das cepas de referência para o controle de qualidade.

Os antibióticos e suas respectivas variações de concentrações utilizados no trabalho estão relacionados nas tabelas 4 e 5 a seguir.

TABELA 4 - ANTIBIÓTICOS TESTADOS E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA TESTE DE CIM EM CEPAS DE *P. aeruginosa*

ANTIBIÓTICOS	CONC. (µg/mL)
Amicacina	1 - 64
Colistina (Polimixina E)	1 - 8
Gentamicina	0,5 - 32
Sulfa/Trimetoprim	9,5/0,5 - 304/16
Tobramicina	0,5 - 32
Ceftazidima	0,5 - 64
Cefepime	1 - 32
Ciprofloxacina	0,25 - 16
Imipenem	0,25 - 32
Meropenem	0,25 - 32

LEGENDA: CONC. – Concentração de antibiótico em µg/mL

TABELA 5 - ANTIBIÓTICOS TESTADOS E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA TESTE DE CIM EM CEPAS DE *S. aureus*

ANTIBIÓTICOS	CONC. (µg/mL)
Eritromicina	0,25 - 16
Gentamicina	1 - 32
Oxacilina	0,5 - 64
Sulfa/Trimetoprim	9,5/0,5 - 304/16
Vancomicina	1 - 16
Ciprofloxacina	0,25 - 16

LEGENDA: CONC. – Concentração do antibiótico em µg/mL

4.12.2 Potência do antibiótico

Antes de pesar o sal, calculou-se a potência do antibiótico através da fórmula abaixo e, quando utilizado medicamento, foi considerado também o valor da pureza.

$$\text{Potência} \quad \text{Peso (mg)} = \frac{[\text{SE (µg/mL)} \times \text{V (mL)}]}{\text{Potência (µg/mg)}}$$

LEGENDA: SE – solução estoque; V – volume.

Utilizou-se medicamento no preparo das soluções estoque de ceftazidima (ABL[®]), meropenem (ASTRA ZENECA[®]), cefepime (BRISTOL MYERS SQUIBB[®]) e imipenem (MERCK[®]) (Apêndice 3). Para os outros antibióticos foram utilizados sais da marca SIGMA[®] cuja potência foi calculada de acordo com a fórmula citada anteriormente.

4.12.3 Concentração das soluções estoque

A partir da maior concentração de antibióticos a ser utilizada, foi calculada a concentração da solução estoque, levando em consideração o tamanho da placa (nº de testes) utilizado. Se a placa utilizava 50 ml de meio de cultura, a solução estoque continha 50 vezes a maior concentração utilizada.

4.12.4 Diluições seriadas

Um ml da solução estoque foi diluída em 1 ml do diluente adequado, geralmente água destilada, nas concentrações desejadas, realizando-se uma diluição de 1:2. Cada ml da solução estoque correspondia a uma concentração 50 vezes maior que a maior concentração de antibiótico a ser testada. A seguir, 1 ml foi retirado e transferido para o próximo tubo com o mesmo volume de diluente. Esse processo repetiu-se até obter a menor concentração desejada através de diluições seriadas.

4.12.5 Preparo das placas

Adicionou-se primeiramente 1 ml da solução estoque à primeira placa com meio de cultura. Um ml de cada diluição seriada citada anteriormente foi adicionada aos

frascos contendo ágar Müller-Hinton previamente preparado de acordo com as instruções do fabricante e mantidos entre 48°C e 50°C em banho-maria. Após a adição de 1 mL de antibiótico com a concentração desejada, os frascos foram agitados por inversão e distribuídos em placas de petri descartáveis e estéreis para solidificarem. Todas as placas foram distribuídas em profundidade de 3 a 4 mm (50 ml de ágar por placa) e o pH final entre 7,2 a 7,4. Após o preparo das placas, estas foram armazenadas à temperatura de 4°C a 8°C por até 5 dias e envolvidas em papel filme para impedir o ressecamento e/ou degradação dos antibióticos. Para a inoculação, as placas foram retiradas do refrigerador e deixadas sob a bancada até atingirem a temperatura ambiente. As placas que continham umidade na superfície do meio foram deixadas por 15 minutos em estufa a 37°C para secagem.

4.12.6 Inoculação, incubação e leitura das placas

Para o inóculo, é recomendada a concentração final de 10^4 UFC. Para obtê-la, primeiramente ajustou-se a suspensão bacteriana à escala 0,5 de McFarland (10^8 UFC/ml). Esta suspensão foi diluída 1:10 a fim de se obter a concentração de 10^7 UFC/ml. Utilizando-se o inoculador, que dispensa de 1 a 2 µl, o resultado foi a concentração final desejada, ou seja, 10^4 UFC.

Distribuíram-se as alíquotas de 100 µl das amostras diluídas em placas de ELISA de 96 poços para um multiinoculador com 96 pinos. As amostras foram inoculadas primeiramente em placa controle sem antibiótico e na sequência, nas demais placas com concentração crescente do antimicrobiano. Ao final, foi inoculada também uma última placa controle sem antimicrobiano, para avaliar a contaminação e a ocorrência do efeito de carreamento significativo de antimicrobianos durante o procedimento.

As placas inoculadas com cepas de *S. aureus* foram incubadas à temperatura de 35°C a 37°C por 16 a 20 horas. Já as placas com cepas de *P. aeruginosa* foram incubadas por 24 horas a 35°C a 37°C antes de serem lidas, pois as cepas mucóides têm crescimento mais lento.

Determinou-se a CIM como sendo a menor concentração que inibiu completamente o crescimento bacteriano, não considerando a película causada pelo depósito bacteriano.

A CIM que inibe o crescimento de 50% dos microrganismos (CIM₅₀) e a CIM que inibe 90% do crescimento (CIM₉₀) foram calculadas por frequência acumulada. A porcentagem de susceptibilidade também foi calculada.

4.13 COLORAÇÃO DE GRAM

As 25 amostras de escarro foram analisadas pela coloração de Gram para avaliação de sua qualidade. As amostras de orofaringe e escarro foram correlacionadas ao crescimento na cultura de acordo com Sadeghi e colaboradores (1994). A coloração de Gram foi realizada de acordo com o método padrão (CHAPIN, K. C., MURRAY, P. R., 1999) e a qualidade microscópica da amostra foi avaliada segundo Katlin e colaboradores (SADEGHI, E., et al, 1994).

Para a avaliação microscópica da qualidade da amostra (SADEGHI, E., et al, 1994) determinou-se a razão (PMN/CEE) entre a presença de polimorfonucleares (PMN) e células epiteliais escamosas (CEE). Com uma razão > 5 as amostras eram representativas e com uma razão < 5 considerou-se que as amostras não eram representativas.

A citologia das amostras foi realizada microscopicamente em objetiva de 100x para a observação da presença de PMN, CEE, células colunares ciliadas (CCC) e

macrófagos. A presença ou ausência de bactérias e as suas propriedades morfológicas foram verificadas em aumento de 1000x.

A Tabela 6 a seguir relaciona as células observadas e os parâmetros utilizados para sua avaliação.

TABELA 6 - AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE DAS AMOSTRAS PELA COLORAÇÃO DE GRAM E PARÂMETROS UTILIZADOS PARA ANÁLISE

Citologia	Parâmetros
	Poucas ≤ 10 p/c
Células Epiteliais Escamosas	Moderado 11-24 p/c
	Muitas ≥ 24 p/c
	Poucos ≤ 10 p/c
Polimorfonucleares	Moderado 11-24 p/c
	Muitos ≥ 24 p/c
Macrófagos	Presentes
	Ausentes
Célula Colunar Ciliada	Presentes
	Ausentes

NOTA: p/c: por campo

4.14 COLETA DE DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES

Para análise dos sintomas de exacerbação pulmonar, foi realizada a busca em prontuários dos sinais e sintomas de exacerbação pulmonar adaptados de Ribeiro e colaboradores (2002).

Os sinais e sintomas de exacerbação pulmonar analisados foram o aumento da tosse, aumento da produção do escarro, febre, anorexia e perda de peso, ausência na escola ou no trabalho, diminuição da tolerância aos exercícios, diminuição da saturação de oxigênio, novos achados à ausculta pulmonar, novos achados à radiografia de tórax e redução de mais de 10% no VEF₁.

Ao aparecimento de algum sinal positivo de exacerbação pulmonar foi dado um ponto, sem atribuir peso aos dados, ou seja, um ponto foi dado ao sinal e sintoma encontrado em prontuário clínico no momento da visita e da coleta de amostra considerando-os idênticos em importância.

Os resultados encontrados nos prontuários dos pacientes no momento da coleta do material para análise foram no mínimo 3 e no máximo 7 dos 10 sinais e sintomas clínicos de exacerbação.

O escore atribuído aos pacientes com exacerbação pulmonar foi ≥ 2 , ou seja, ao aparecer 2 ou mais sinais e sintomas clínicos, o paciente foi considerado exacerbado. Já os pacientes com menos de 2 sinais e sintomas de exacerbação pulmonar foram considerados não exacerbados. Atribuiu-se zero ao não aparecimento de sinal e sintoma e o resultado dessa pontuação gerou o escore de sinais e sintomas variável de 0 a 6.

A partir da determinação da frequência de sinais e sintomas obtidos na análise de prontuário, sem atribuir peso a qualquer sinal clínico, foi definido arbitrariamente que o paciente que obteve o escore de sinais e sintomas ≥ 2 , foi considerado positivo para exacerbação pulmonar e um escore < 2 foi característico dos pacientes não exacerbados.

4.15 CONTAGEM DE COLÔNIAS E EXACERBAÇÃO PULMONAR

Avaliou-se a correlação entre a contagem de colônias e a exacerbação do paciente pelo teste de associação de Fisher que permitiram elucidar os achados neste estudo.

São consideradas contagens significativas, ou seja, que podem estar relacionadas com a sintomatologia dos pacientes com exacerbação pulmonar,

$>10^6$ UFC/mL para *P. aeruginosa* e $>10^6$ UFC/mL para *S. aureus* (BAQUERO, F., et al, 1996).

Foi analisada a associação da exacerbação pulmonar com 3 variáveis: contagem de colônias do total bactérias isoladas; contagem de colônias de *P. aeruginosa*; e contagem de colônias de *S. aureus*.

5 RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 38 pacientes dos quais obteve-se 144 amostras de múltiplas coletas, sendo 90 amostras de escarro e 54 amostras de orofaringe. Do total de amostras originou-se 206 isolados bacterianos, dos quais 100 foram de *P.aeruginosa*, 11 de *H. influenzae*, 81 de *S. aureus*, 9 isolados do complexo *B. cepacia*, e outras bactérias em menor número totalizando 5: dois isolados de *S. marscecens*, e *S. maltophilia*, *K. pneumoniae* e *A. baumannii* com um isolado. Das 90 amostras de escarro foram cultivadas 53 para pesquisa de fungos e 70 para pesquisa de micobactérias. Dessas culturas, foram obtidos quatro isolados de *Aspergillus* sp. e não foi isolado *Mycobacterium* sp.

Realizou-se a caracterização fenotípica para 81 isolados de *S. aureus*, nove isolados do complexo *B. cepacia* e 83 isolados de *P. aeruginosa*. Do total de bactérias isoladas, realizou-se a análise da concentração inibitória mínima em 68 amostras de *S.aureus* e 88 amostras de *P. aeruginosa*.

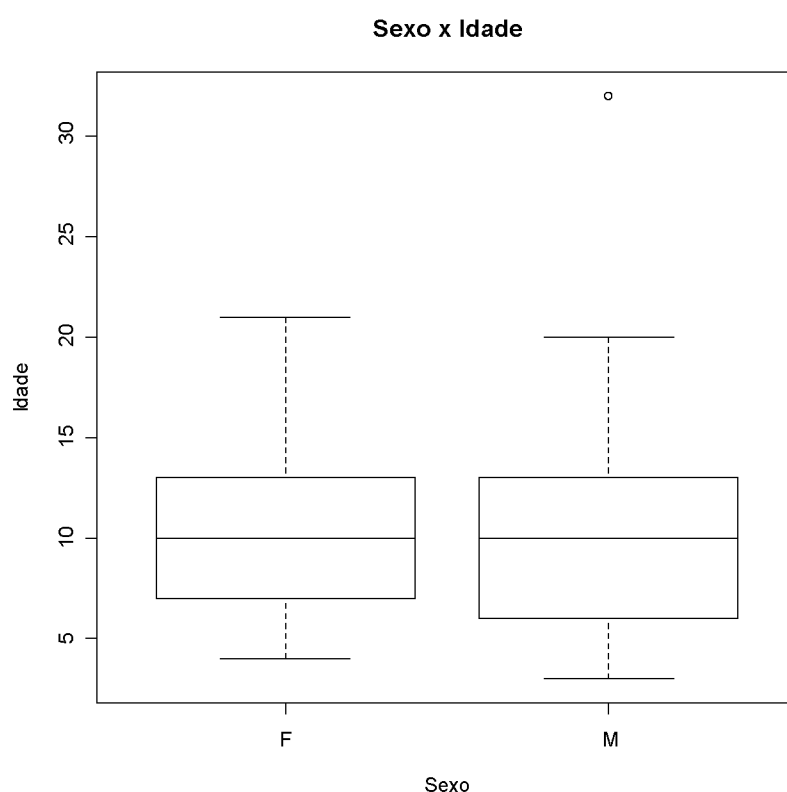
Por fim, observou-se a relação entre as propriedades morfotintoriais observadas na coloração de Gram e o crescimento na cultura para 51 amostras, sendo que, 25 eram de escarro e 26 de orofaringe.

A figura a seguir representa um diagrama resumido das etapas da pesquisa desde a obtenção das amostras, os microrganismos isolados e as respectivas análises até a conclusão do experimento.

5.1 DADOS DOS PACIENTES

Dos 38 pacientes incluídos no estudo, 17 (44,7%) eram do sexo masculino e 21 (55,3%) do sexo feminino. As idades destes variaram de 3 a 32 anos, com média de 10,7 anos. Para os pacientes do sexo masculino, a média de idade foi de 11,1 anos e para pacientes do sexo feminino de 10,4 anos de idade. O gráfico a seguir mostra a distribuição dos dados de sexo e média de idade desses pacientes.

GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DA IDADE DOS 38 PACIENTES POR SEXO



LEGENDA: M – masculino; F – feminino.

5.2 MICRORGANISMOS ISOLADOS

Do total de 144 amostras clínicas dos 38 pacientes foram obtidos 206 isolados bacterianos.

Pseudomonas aeruginosa apresentou maior número de isolados com 100 amostras (48,5%), 45 (21,8%) isolados mucóides e 55 (26,7%) de isolados não-mucóides, seguida por *S. aureus* (39,3%), *H. influenzae* (5,3%), complexo *B. cepacia* (4,4%), *S. marcescens* (1%), *S. maltophilia* (0,5%), *K. pneumoniae* (0,5%) e *A.baumannii* (0,5%), (Tabela 7). Em 17 dos 38 pacientes foram isolados concomitantemente *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

TABELA 7 – FREQUÊNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS EM AMOSTRAS DOS PACIENTES COM FC NO PERÍODO DE 14 MESES

BACTÉRIA	Nº ISOLADOS	% ISOLADOS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
não-mucóide	55	26,7
mucóide	45	21,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	81	39,3
<i>Haemophilus influenzae</i>	11	5,3
Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	9	4,4
<i>Serratia marcescens</i>	2	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0,5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	0,5
TOTAL	206	100

Do total de 53 amostras cultivadas para pesquisa de fungos, foram encontrados 4 isolados de *Aspergillus* sp, ou seja, 7,5% do total de amostras. Esses pacientes não

apresentaram *Aspergillus* sp. como único germe, ainda estavam presentes *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

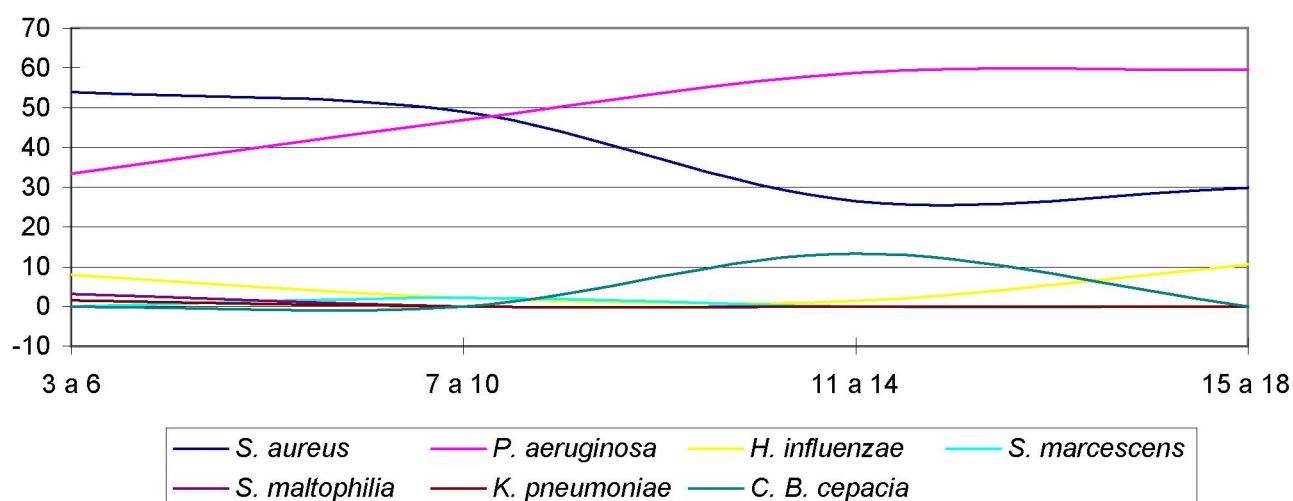
Não houve crescimento de *Mycobacterium* sp. em nenhuma das 70 amostras cultivadas.

Com relação à distribuição das diferentes espécies de bactérias por faixa etária, observa-se no Gráfico 2, uma maior porcentagem de *S. aureus* na faixa etária de 3 a 6 anos de idade (53,9%), ocorrendo uma redução na faixa etária de 7 a 10 anos (48,9%) e outra queda acentuada na faixa de 11 a 14 anos (26,5%) até chegar em cerca de 30% na faixa etária de 15 anos a 18 anos. Houve apenas um paciente com faixa etária superior a 18 anos, por isso não foi incluído na curva.

Por outro lado, *P. aeruginosa* apresentou uma porcentagem de 33,3% na faixa de 3 a 6 anos, ocorrendo um aumento gradativo na faixa de 7 a 10 anos (46,8%) e um pouco maior na faixa de 11 a 14 anos (58,8%), estabilizando-se na faixa etária de 15 a 18 anos em aproximadamente 60%.

Os outros microrganismos mantiveram-se estáveis na curva, porém bactérias do complexo *B. cepacia* tiveram um pico de 13,2% na faixa etária de 11 a 14 anos.

GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS NAS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS



5.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

5.3.1 Caracterização fenotípica das amostras de *Pseudomonas aeruginosa*

Foram identificados 83 isolados de *P. aeruginosa* através das provas bioquímicas específicas citadas no item 4.10.1 de Material e Métodos. Com relação à morfologia colonial, 39 isolados clínicos apresentaram fenótipo mucóide e 44 possuíam características não-mucóides.

A confirmação da caracterização fenotípica dos demais isolados clínicos de *P.aeruginosa* (17 isolados) não foi realizada por ter ocorrido perda de viabilidade durante o processo de descongelamento das bactérias ou falha na separação das amostras após cultura para a realização das análises.

Os resultados encontrados estão demonstrados na Tabela 8 a seguir.

TABELA 8 - CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DOS 83 ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa*

TESTE		Não-mucóide (%) n = 44	Mucóide (%) n = 39
Oxidase		100	100
Crescimento em:	MacConkey	100	100
	Cetrimide 33°C	100	100
	Cetrimide 42°C	100	100
Redução do nitrato		90,5	97,5
Gás do nitrato		73,8	82,5
Piocianina		59,5	25
Hidrólise da:	Gelatina	66,7	85
	Acetamida	97,6	97,5
Ácido de*:	Glicose	100	100

LEGENDA: %, resultados em porcentagem de positividade em um total de 44 cepas não-mucóides e 39 cepas mucóides de *P. aeruginosa* isoladas. * Realizado em meio Oxidativo-Fermentativo basal (OF basal) com 1% de glicose.

5.3.2 Caracterização fenotípica das amostras do complexo *B. cepacia*

Todos os 9 isolados clínicos do complexo *B. cepacia* desenvolvidos em ágar BCSA apresentaram características fenotípicas que não foram suficientes para designar especificamente o tipo de variante genômica a que pertenciam.

As principais características bioquímicas encontradas estão descritas na Tabela 9 a seguir.

TABELA 9 - CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DOS 9 ISOLADOS CLÍNICOS DE BACTÉRIAS DO COMPLEXO *Burkholderia cepacia*

TESTE	Complexo <i>B. cepacia</i> (%) n = 9
Oxidase	100
Oxidação de:	
Sacarose	100
Adonitol	75
Lactose	75
Descaboxilação da lisina	87,5
Descaboxilação da ornitina	75
Liquefação da gelatina	75
Hidrólise da esculina	50
Crescimento a 42°C	100
β-hemólise	25
Crescimento em BCSA	100

LEGENDA: %, resultados em porcentagem de positividade em um total de 9 cepas isoladas do complexo *Burkholderia cepacia*; BCSA, ágar seletivo para *Burkholderia cepacia*

5.3.3 Identificação das amostras de *Staphylococcus aureus*

Dos 81 isolados clínicos de *S. aureus* obtidos, todos apresentaram positividade nas provas da catalase e coagulase com plasma de coelho, crescimento em placas de

Ágar Manitol Salgado (manitol e NaCl 6,5%) e fermentação do manitol em tubos contendo meio sólido em camada alta.

Para os outros microrganismos não foi realizada a caracterização fenotípica da espécie, pois o número de isolados foi muito baixo e o trabalho ateve-se aos microrganismos mais significativos em FC.

5.4 SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

5.4.1 Teste de disco-difusão de Kirby-Bauer

Pseudomonas aeruginosa foi sensível à grande maioria dos antibióticos testados, sendo que apresentou 100% de sensibilidade a polimixina B e polimixina E (colistin). A sensibilidade mais baixa nos isolados mucóides foi à gentamicina os (70%) e nos isolados não-mucóides à ceftazidima (80%). (Tabelas 10 e 11)

TABELA 10 - PORCENTAGEM DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS POR DISCO-DIFUSÃO EM 40 ISOLADOS DE *P. aeruginosa* MUCÓIDE

ANTIBIÓTICOS	% Sensibilidade
Amicacina	87,5
Cefepime	95
Ceftazidima	85
Ciprofloxacino	70
Polimixina E (Colistin)	100
Gentamicina	70
Imipenem	90
Meropenem	98
Polimixina B	100

TABELA 11 - PORCENTAGEM DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS POR DISCO-DIFUSÃO EM 45 ISOLADOS DE *P. aeruginosa* NÃO-MUCÓIDE

ANTIBIÓTICOS	% Sensibilidade
Amicacina	91,11
Cefepime	84,4
Ceftazidima	80
Ciprofloxacino	86,7
Polimixina E (Colistin)	100
Gentamicina	93,3
Imipenem	93,3
Meropenem	98
Polimixina B	100

Dos 81 isolados de *S. aureus*, 16 amostras (provenientes de 7 pacientes) ou 19,75% foram MRSA. Este dado confirmou-se pela realização do teste de triagem para o gene *mecA*, gene que confere resistência a esse antibiótico. As demais amostras de *S. aureus* mostraram-se sensíveis à oxacilina (MSSA). Dentre os demais antibióticos testados, a vancomicina apresentou sensibilidade máxima de 100%, seguida da gentamicina, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina e penicilina com 25,95% de sensibilidade. (Tabela 12)

TABELA 12 - PORCENTAGEM DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS POR DISCO-DIFUSÃO EM 81 ISOLADOS DE *S. aureus*

ANTIBIÓTICOS	% Sensibilidade
Ciprofloxacino	81,48
Clindamicina	77,78
Eritromicina	65,43
Gentamicina	83,95
Oxacilina	80,25
Penicilina	25,92
Sulfa-trimetoprim	71,6
Vancomicina	100

5.4.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

5.4.2.1 Resultados de CIM para *P. aeruginosa* mucóide e não-mucóide

As tabelas 13 e 14 a seguir apresentam os resultados da CIM e os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ para *P. aeruginosa* mucóide e não-mucóide.

Na tabela 13, observa-se que o colistin apresentou maior sensibilidade entre os antibióticos testados (100%), seguido por ciprofloxacino (94,74%), tobramicina (92,3%) e com sensibilidade sucessivamente menor está o meropenem, imipenem, cefepime, amicacina, ceftazidima, gentamicina e sulfametoxazol-trimetoprim, este último com menor atividade e conseqüentemente menor sensibilidade (17,95%). Por outro lado a potência dos antibióticos foi melhor para meropenem (CIM₅₀ < 0,25 µg/ml) seguida por imipenem e tobramicina, ceftazidima, cefepime e amicacina, colistin, ciprofloxacina e por último sulfametoxazol-trimetoprim.

Dentre os carbapenêmicos, o meropenem apresentou sensibilidade ligeiramente superior (89,74%) ao imipenem (86,84%).

A sensibilidade de imipenem e de cefepime foi a mesma (86,84%), entretanto o imipenem, como se esperava, apresentou maior potência (CIM₅₀ = 2 µg/ml).

TABELA 13 - CIM₅₀, CIM₉₀ E PORCENTAGEM DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS POR DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA 38 ISOLADOS DE *P. aeruginosa* MUCÓIDE

Antibiótico	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)	% Sensibilidade
Amicacina	16	64	78,95
Cefepime	4	32	86,84
Ceftazidima	2	64	73,68
Ciprofloxacino	1	2	94,74
Colistin (Polimixina E)	1	2	100
Gentamicina	4	16	55,26
Imipenem	2	32	86,84
Meropenem	≤0,25	4	89,74
Sulfametoxazol-Trimetoprim	152/8	>304/16	17,95
Tobramicina	1	4	92,3

LEGENDA: S – sensível; I – intermediário; R – resistente.

Na Tabela 14 a seguir, para *P. aeruginosa* não-mucóide observou-se a melhor sensibilidade com meropenem e colistin (100%), seguido de ciprofloxacino, amicacina, tobramicina, imipenem, cefepime, gentamicina, ceftazidima e o que apresentou menor sensibilidade, sulfametoxazol-trimetoprim (11,36%).

A melhor potência observada foi para meropenem (CIM₅₀ = 0,5µg/ml), seguida de imipenem, ciprofloxacino, tobramicina, ceftazidima, amicacina, cefepime, colistin e por último, sulfametoxazol-trimetoprim (CIM₅₀ > 152/8 µg/ml).

Da mesma forma que na tabela anterior, com relação aos carbapenêmicos, os isolados de *P. aeruginosa* não-mucóide apresentaram-se mais sensíveis a meropenem.

TABELA 14 - CIM₅₀, CIM₉₀ E PORCENTAGEM DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS POR DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA 50 ISOLADOS DE *P. aeruginosa* NÃO-MUCÓIDE

Antibiótico	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)	% Sensibilidade
Amicacina	8	16	92
Cefepime	4	32	82
Ceftazidima	16	64	60
Ciprofloxacino	≤0,25	1	94
Colistin (Polimixina E)	1	2	100
Gentamicina	4	16	66
Imipenem	2	16	86
Meropenem	0,5	4	100
Sulfametoxazol-Trimetoprim	>152/8	>304/16	12
Tobramicina	≤2	8	88

LEGENDA: S – sensível; I – intermediário; R – resistente.

Quando analisamos a sensibilidade dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* mucóide e não-mucóide juntas (Tabela 15), podemos observar que no resultado de CIM, colistin (100%), meropenem (94,87%) e ciprofloxacino (94,37%) foram os antibióticos que apresentaram a melhor atividade *in vitro*. Além disso, também apresentaram boa sensibilidade neste estudo os seguintes antibióticos, tobramicina (90,15%), imipenem (86,42%), amicacina (85,47%) e cefepime (84,42%).

Dentre os aminoglicosídeos, antibióticos muito utilizados clinicamente para esta patologia, a melhor sensibilidade foi observada para tobramicina (90,15%). Amicacina e gentamicina apresentaram sensibilidade menor nesta população de bactérias.

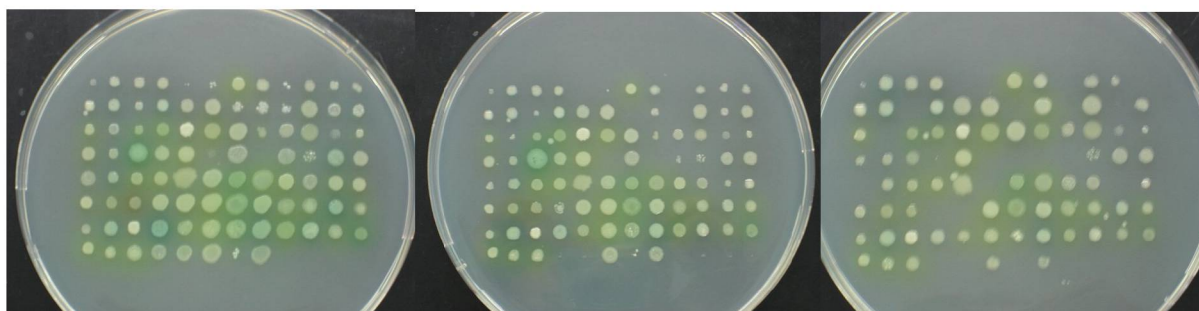
Com relação aos carbapenêmicos, observou-se melhor sensibilidade ao meropenem (94,87%) do que ao imipenem (86,42%).

TABELA 15 - PORCENTAGEM DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS POR DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA 88 ISOLADOS DE *P. aeruginosa*

Antibiótico	% Sensibilidade
Amicacina	85,47
Cefepime	84,42
Ceftazidima	72,84
Ciprofloxacina	94,37
Colistin (Polimixina E)*	100
Gentamicina	60,63
Imipenem	86,42
Meropenem	94,87
Sulfametoxazol-Trimetoprim	14,97
Tobramicina	90,15

A Figura 5 a seguir mostra um exemplo de diluição seriada em cepas de *P.aeruginosa* cujo meio de cultura contém concentrações de 1, 2 e 4 µg/ml de amicacina respectivamente.

FIGURA 5 - CIM DE *P. aeruginosa* NAS CONCENTRAÇÕES DE 1, 2 E 4 µg/ml DE AMICACINA RESPECTIVAMENTE



FONTE: Setor de Bacteriologia – HC, UFPR.

5.4.2.2 Resultados de CIM para *S. aureus*

Com relação aos dados apresentados na Tabela 16, o antibiótico com melhor potência e atividade foi a vancomicina com CIM₅₀ e CIM₉₀ de 0,5 µg/ml. O segundo

antibiótico com boa sensibilidade foi sulfametoxazol-trimetoprim, seguido por oxacilina (80,88%), gentamicina, ciprofloxacina e por último a eritromicina com 58,85% de sensibilidade.

Analisando-se os resultados de CIM dos 68 isolados de *S. aureus* por paciente, do total de 33 pacientes com *S. aureus*, 13 isolados de 6 pacientes apresentaram-se resistentes à oxacilina, o que confirma os achados em disco-difusão. Esse número representou 19,22% dos 68 isolados de *S. aureus*.

TABELA 16 - CIM₅₀, CIM₉₀ E PORCENTAGEM DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS POR DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA 68 ISOLADOS DE *S. aureus*

Antibiótico	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)	% Sensibilidade
Ciprofloxacina	0,5	16	73,52
Eritromicina	≤0,25	>16	58,85
Gentamicina	≤1	>32	75
Oxacilina	1	>64	80,88
Sulfametoxazol-Trimetoprim	≤9,5/0,5	304/16	82,35
Vancomicina	≤0,5	≤0,5	100

LEGENDA: S – sensível; I – intermediário; R – resistente.

Na Figura 6 encontra-se um exemplo de CIM para *S. aureus* com diluição de 16µg/mL de oxacilina, onde só houve crescimento de MRSA, pois o ponto de corte para isolados clínicos oxacilina-resistentes é ≥ 4 µg/ml.

FIGURA 6 - CIM PARA *S. aureus* NA CONCENTRAÇÃO DE 16µg/mL DE OXACILINA



FONTE: Setor de Bacteriologia – HC, UFPR.

5.5 AVALIAÇÃO DA COLORAÇÃO DE GRAM

Foram analisadas 51 amostras de pacientes com FC, sendo 25 (49%) amostras de escarro e 26 (51%) amostras de orofaringe.

Para avaliar a qualidade das 25 amostras de escarro relacionando a presença de polimorfonucleares (PMN) e células epiteliais escamosas (CEE), foi determinada a razão entre essas variáveis (PMN/CEE). Em 60% dos casos, eram representativas (razão > 5) e em 40% dos casos, não eram representativas (razão foi < 5) pelo critério de Katlin e colaboradores, (SADEGHI, E., et al, 1994), porém todas as amostras foram cultivadas para relacioná-las ao resultado da cultura.

Analisou-se 25 amostras de escarro e 26 amostras de orofaringe para a observação da relação entre as propriedades morfotintoriais dos microrganismos e o seu crescimento na cultura.

Nesta análise, observou-se boa correlação entre a observação das propriedades morfotintoriais dos microrganismos e a espécie isolada na cultura em 75,7% das amostras analisadas. O valor de p obtido nesta análise foi significativo ($p < 0,05$).

5.6 DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES

Foi realizada a busca dos dados clínicos em prontuários dos 38 pacientes no momento da coleta de amostras para análise microbiológica.

Os sinais e sintomas analisados e respectivas frequências encontradas estão apresentadas de forma descritiva na Tabela 16 a seguir.

Das 139 consultas médicas nas quais também houve coleta de amostras (Tabela 17), foram reportados 100% dos sinais e sintomas de aumento da tosse, anorexia ou perda de peso e febre. Destes, foram positivos 44, 22 e 14 sinais respectivamente. Entretanto, alguns dados clínicos não foram reportados em todos os pacientes. A diminuição de tolerância a exercícios foi encontrada 41 vezes, o aumento de escarro 59 vezes, a diminuição da saturação de O₂ 6 vezes e foi observada a ausência na escola ou trabalho 22 vezes. Dessas características, foram reportadas positivas 23, 11, 4 e 1 respectivamente.

Os demais sinais de novos achados na ausculta pulmonar, novos achados em RX de tórax e redução em 10% no VEF₁ não foram reportados.

TABELA 17 - SINAIS E SINTOMAS DE EXACERBAÇÃO PULMONAR DOS 38 PACIENTES COM FC E SUAS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS

Sinais e sintomas encontrados	N	Total
Aumento da tosse	44	139
Diminuição da tolerância a exercícios	23	41
Anorexia/Perda de Peso	22	139
Febre	14	139
Aumento do escarro	11	59
Diminuição na Saturação de O ₂	4	6
Ausência na escola/Trabalho	1	22

NOTA: N – número de vezes onde os sinais e sintomas de exacerbação pulmonar foram positivos; Total – número total de vezes em que os sinais e sintomas foram registrados em prontuário clínico a cada visita ao ambulatório de FC do HC-UFPR.

A Tabela 18 apresenta a frequência do escore encontrado para pacientes com cultura quantitativa de escarro.

TABELA 18 - FREQUÊNCIA E PORCENTAGEM DOS ESCORES DOS PACIENTES COM CULTURA QUANTITATIVA DE ESCARRO

ESCORE	FREQUÊNCIA	%	
0	41	46,06	} NÃO EXACERBADOS
1	24	26,97	
2	16	17,98	
3	5	5,62	} EXACERBADOS
4 a 6	3	3,37	
TOTAL	89	100	

Foram encontrados sinais e sintomas no dia da coleta de 89 das 90 amostras de escarro analisadas. Em apenas uma das visitas não foi encontrado nenhum sinal em prontuário. A porcentagem de pacientes considerados não exacerbados (escore < 2) foi de 73,03% e 26,97% dos pacientes que apresentavam dois ou mais sinais e sintomas de exacerbação foram considerados exacerbados pelo critério estabelecido para este estudo.

A partir desse resultado foi correlacionada a exacerbação pulmonar dos pacientes com FC ao uso de antibióticos e também à contagem de colônias obtida na cultura quantitativa.

5.7 USO DE ANTIBIÓTICOS

Ao analisarmos o uso de antibióticos no momento da coleta das amostras para cultura, observamos que em 89,71% das consultas, os pacientes faziam uso de antibióticos. Destas, em 72,79% os pacientes não apresentavam exacerbação pulmonar pelos critérios deste estudo. Nas outras 16,91%, os pacientes apresentavam sintomas de exacerbação e estavam utilizando antibióticos. Em apenas 10,29% das consultas, os

pacientes não estavam utilizando antibióticos e não apresentavam sintomas de exacerbação pulmonar.

Associando-se os dados de exacerbação pulmonar ao uso de antibióticos, observou-se que não houve relação entre as variáveis ($p > 0,05$).

5.8 CONTAGEM DE COLÔNIAS

Através da contagem de colônias foi realizada a análise entre cultura quantitativa e os sintomas de exacerbação pulmonar.

A tabela utilizada para realizar a associação de contagem de colônias e exacerbação pulmonar está relacionada no Apêndice 1. Esta tabela apresenta os dados de contagem de colônias dos microrganismos que foram isolados a cada coleta em 31 pacientes com cultura quantitativa avaliados. Dos 7 pacientes restantes foram coletadas amostras de orofaringe, pois os pacientes apresentavam dificuldade de expectoração espontânea.

5.9 CONTAGEM DE COLÔNIAS E EXACERBAÇÃO PULMONAR

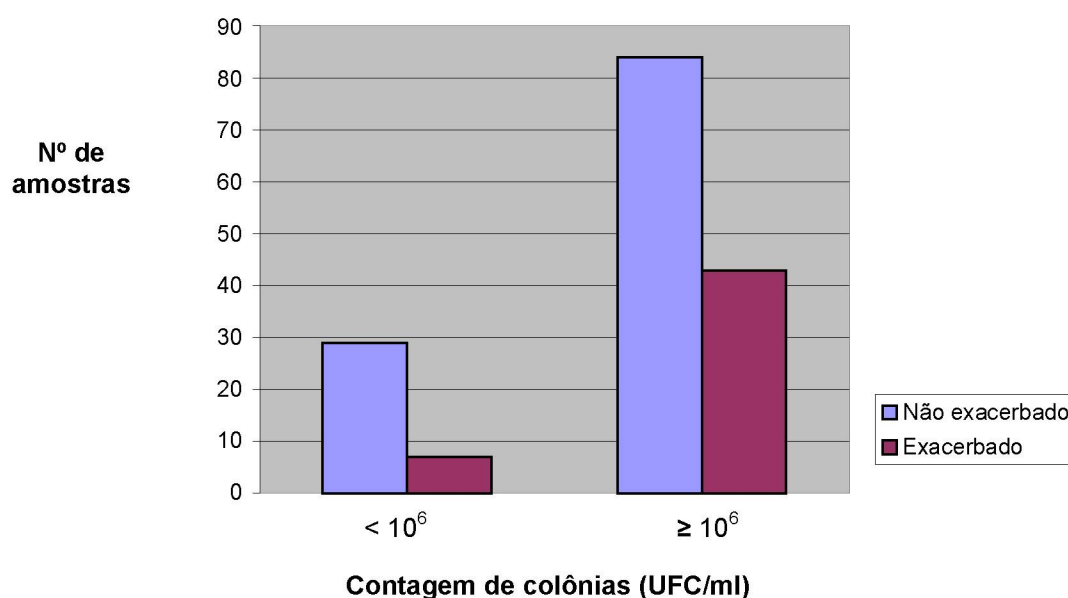
A associação entre a exacerbação pulmonar e as contagens de colônias de $<10^5$ UFC/ml e $\geq 10^6$ UFC/ml foi realizada como seguem descritas nos itens a seguir.

5.9.1 Exacerbação X contagem de colônias no total de bactérias isoladas

Esta análise foi realizada para todas as 163 bactérias obtidas da cultura quantitativa de 89 coletas de escarro dos 31 pacientes analisados. O Gráfico 3 a seguir mostra a associação entre as duas variáveis.

Não foi observada relação entre a cultura quantitativa de escarro e os sinais e sintomas de exacerbação pulmonar dos pacientes com FC, pois o valor de p encontrado nesta análise foi $p > 0,05$ ($p = 0,1469$).

GRÁFICO 3 - EXACEBAÇÃO E CONTAGEM DE COLÔNIAS NO TOTAL DE 163 BACTÉRIAS ISOLADAS



LEGENDA: UFC – unidades formadoras de colônias.

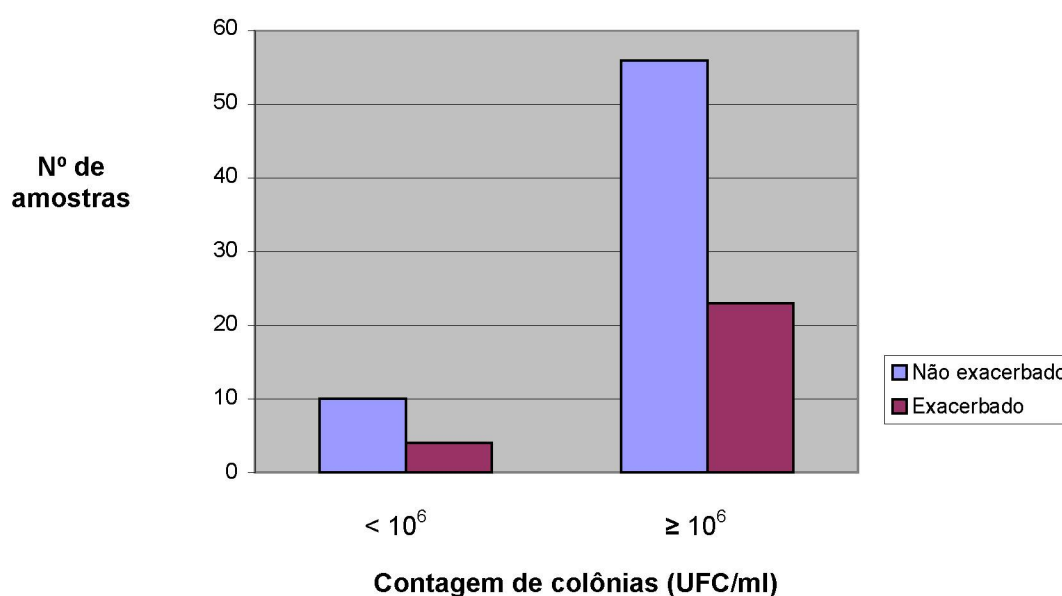
Considerando-se que houve crescimento de mais de um microrganismo por coleta, foi realizada a análise por bactéria para o total de *P. aeruginosa* (mucóide e não-mucóide) e para *S. aureus* verificando se existia alguma associação. Para bactérias do complexo *B.cepacia* não foi realizada a análise, pois o número de isolados era baixo para avaliarmos estatisticamente.

5.9.2 Exacerbação X contagem de colônias para o total de *P. aeruginosa*

Para a análise desses dados, foi considerado o número total de amostras de *P. aeruginosa* das 89 coletas de escarro obtidas neste estudo.

No Gráfico 4 encontram-se os dados de exacerbação pulmonar e de contagem de colônias nas 93 amostras de *P. aeruginosa* analisadas.

GRÁFICO 4 - EXACEBAÇÃO E CONTAGEM DE COLÔNIAS NO TOTAL DE 93 AMOSTRAS DE *P. aeruginosa*



LEGENDA: UFC – unidades formadoras de colônias.

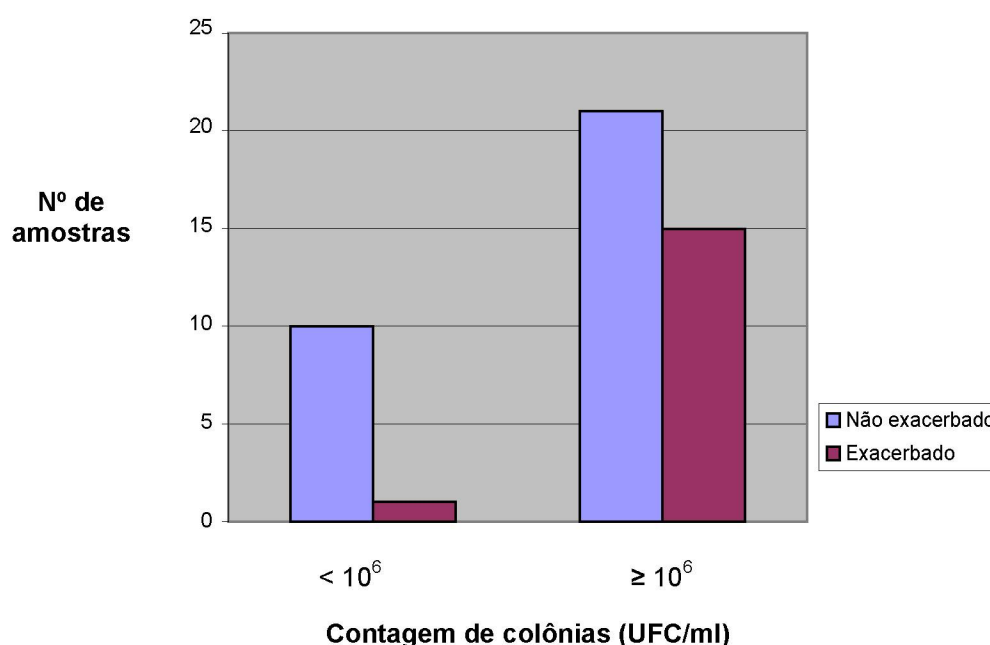
Neste caso também não houve associação entre as duas variáveis analisadas, pois foi obtido $p > 0,05$ (p valor = 0,9999).

5.9.3 Exacerbação X contagem de colônias para o total de *S. aureus*

Para esta avaliação, foi utilizado o número total de amostras de *S. aureus* isolados das culturas quantitativas.

Observa-se a distribuição do número de amostras obtidas no Gráfico 5 a seguir.

GRÁFICO 5 - EXACEBAÇÃO E CONTAGEM DE COLÔNIAS NO TOTAL DE 46 AMOSTRAS DE *S. aureus*



LEGENDA: UFC – unidades formadoras de colônias.

Nesta avaliação, foi calculado o valor de $p = 0,01875$ ($p < 0,05$). Portanto, o resultado obtido revelou que para as amostras de *S. aureus* houve associação entre as variáveis.

6 DISCUSSÃO

A porcentagem de patógenos do total das amostras analisadas neste estudo foi 48,5% para *P. aeruginosa*, considerando isolados mucóides (21,8%) e não-mucóides (26,7%), seguida por 39,3% para *S. aureus*, 5,3% para *H. influenzae*, 4,4% de bactérias do complexo *B. cepacia*, 1% para *S. marcescens*, 0,5% para *S. matophilia*, 0,5% para *K. pneumoniae* e 0,5% de *A. baumannii*. Estes dados foram um pouco mais baixos quando comparados aos do *National Cystic Fibrosis Registry*, 1996, que incluiu 17.620 pacientes com FC e relatou presença de *P. aeruginosa* (59,9%), *S. aureus* (37,5%), *H. influenzae* (15,4%) e *B. cepacia* (3,6%). Por outro lado, são condizentes aos estudos de Santana, 2003, o qual explica que a diferença encontrada no nosso estudo pode ser devido ao menor número de amostras analisadas e à sua origem.

Para cultura da amostra para bacilos álcool-ácido resistente (BAAR), é necessário eliminar a microbiota associada, que por se desenvolver muito mais rapidamente que o bacilo de tuberculose, impediria sua multiplicação. Devido ao conteúdo lipídico, o bacilo é capaz de resistir muito mais que outras bactérias à ação de certas substâncias químicas, como por exemplo, as bases fortes. Esta propriedade permite a destruição da microbiota associada nas amostras a semear. Portanto, para descontaminar a amostra necessita-se de uma substância que permita a liquefação do muco e da fibrina, a destruição dos germes associados e a conservação da viabilidade do bacilo da tuberculose.

P. aeruginosa, em particular, está presente no trato respiratório em mais de 80% dos pacientes com FC. Tipicamente, a bactéria sobrevive à rotina de descontaminação do escarro pelo método de Petroff. Então, para a erradicação do crescimento de *P. aeruginosa*, o procedimento laboratorial mais comumente utilizado recomenda o

tratamento com 5% de ácido oxálico para amostras do trato respiratório de pacientes com FC. (BANGE, F-C.; KIRSCHNER, P.; BÖTTGER, E., 1999)

As culturas realizadas para fungos e micobactérias, na sua maioria, estiveram com problema de contaminação, ou seja, não houve descontaminação apropriada da amostra utilizando-se o método de Petroff para cultura de escarro de pacientes não fibrocísticos. Na tentativa de corrigir os problemas de contaminação das culturas de micobactérias foi introduzida a metodologia de descontaminação indicada para amostras de pacientes com fibrose cística. A técnica adotada foi a de Bange e colaboradores (1999) modificada pela utilização de ditionthreitol 0,1% com NaOH e ácido oxálico.

Apesar disso, o problema da contaminação continuou devido às altas contagens de colônias dos pacientes de FC, principalmente de *P. aeruginosa*. Devido ao resultado pouco satisfatório das metodologias de descontaminação utilizadas, não foi dado prosseguimento ao isolamento desse microrganismo. É necessário realizar estudos específicos e extensos a fim de que os resultados sejam mais conclusivos.

Os fungos filamentosos também são prejudicados em seu crescimento devido à contaminação por *P. aeruginosa*. Apesar disso, o crescimento é melhor e, conseqüentemente, a recuperação destes microrganismos obteve maior sucesso.

Um paciente entre quatro onde foi isolado *Aspergillus* sp. apresentou características clínicas de aspergilose broncopulmonar alérgica (ABA). Normalmente, os pacientes não manifestam características clínicas de ABA por serem colonizados por outros microrganismos, como no caso dos outros 3 pacientes colonizados por *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Os microrganismos que causam infecção pulmonar nas diferentes faixas etárias mostradas no Gráfico 1, permitem visualizar a realidade deste hospital. A porcentagem de pacientes na faixa etária de 2 a 5 anos inicialmente colonizados com *S. aureus* é

mais alta que *P. aeruginosa*, os dois patógenos mais freqüentes em FC. No decorrer dos anos, essa porcentagem decresce dando lugar ao maior número de pacientes colonizados por *P. aeruginosa*, na faixa etária de 6 a 10 anos de idade. O número maior de pacientes neste trabalho, encontra-se na faixa de 2 a 10 anos, o que explica a pequena queda na porcentagem de microrganismos na faixa etária de 11 a 31 anos de idade. No entanto, pode-se dizer que os padrões de colonização dos pacientes com FC no HC estão de acordo com os dados do *Cystic Fibrosis Patient Registry*, 2002 da Fundação Americana de Fibrose Cística.

Alguns autores sugerem que *S. aureus* predispõe a colonização por *P. aeruginosa* e neste gráfico, pode-se observar que o primeiro microrganismo a colonizar o paciente com FC realmente é *S. aureus*. Segundo Lyczak e colaboradores (2002), a predisposição à colonização por *P. aeruginosa* poderia estar relacionada à terapia anti-estafilocócica, uma vez que este microrganismo se instala ao epitélio danificado por infecção viral ou colonização prévia por outra bactéria que neste caso seria *S. aureus*.

Dados do estudo de Souza, H. A. P. H. M. e colaboradores (2005) realizado em pacientes fibrocísticos com faixa etária abaixo de 3 anos de idade no Hospital de Clínicas da UFPR demostram que o primeiro microrganismo associado à colonização ou infecção do paciente neste hospital é *S. aureus* com um tempo de persistência de até 70 meses. Com relação à *P. aeruginosa* este mesmo estudo demonstrou um baixo número de isolados com colonização não persistente (SOUZA, H. A. P. H. M. , et al, 2005).

Os dados encontrados na identificação bioquímica de *P. aeruginosa* foram condizentes com os encontrados na literatura. Uma das principais características de diferenciação entre os isolados mucóides e não-mucóides é a produção de piocianina.

As cepas que não produzem esse pigmento geralmente são mucóides (KISKA, D. L.; GILLIGAN, P. H., 2003), o que ocorreu em 75% das amostras analisadas.

O crescimento em 42°C também é uma característica importante avaliada para diferenciar *P. aeruginosa* de outras espécies, além disso, essa espécie é também a única do grupo que hidrolisa a acetamida. Neste trabalho, 97,5% dos isolados foram positivos para este teste.

Para identificação das variantes genômicas do complexo *Burkholderia cepacia*, as provas bioquímicas não são suficientes. Essa dificuldade ocorre por que as características fenotípicas variantes são numerosas entre os isolados, dificultando a identificação. Portanto, as bactérias isoladas do grupo são denominadas do complexo *Burkholderia cepacia*. Avaliações moleculares entre as cepas seriam mais adequadas para caracterizá-las.

As bactérias com menor importância em FC poderão ser analisadas em outro momento e, além disso, é necessário um maior número de amostras para que sejam realizadas análises de caráter significativo.

A análise da sensibilidade dos isolados de *P. aeruginosa*, testados pelo método de diluição em ágar, mostra que os graus de resistência aos antimicrobianos indicados para tratamento de pacientes com FC é maior em isolados mucóides, exceto para cefepime, ceftazidima, sulfametoxazol-trimetoprim e tobramicina, que mostram diferença não significativa.

Os isolados de *P. aeruginosa* neste estudo apresentaram, em média, uma suscetibilidade menor aos antibióticos do que outros estudos (SILBERT, S., et al, 2001) sendo a principal diferença encontrada na sensibilidade ao imipenem, com aproximadamente 86% das cepas sensíveis quando comparado a 93% de sensibilidade dos isolados encontrados nos pacientes de outro estudo (SILBERT, S., et al, 2001). Meropenem apresentou alta taxa de sensibilidade (>90%) em ambos os estudos.

A ocorrência de um índice maior de resistência a imipenem pode ser atribuída ao pequeno número de pacientes com múltiplos isolados que apresentam *P.aeruginosa* resistente a esse antibiótico. Existe a suspeita, pela análise de CIM, que esses isolados possam ser semelhantes. A comprovação dessa suspeita poderá ser confirmada após análise molecular.

Com relação à resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa*, esta pode se manifestar através de dois mecanismos distintos muito conhecidos. O primeiro e mais comum consiste na interação de dois fatores: o decréscimo da permeabilidade provocada pela perda de porinas específicas (OprD) e a hiperregulação de bomba de efluxo a múltiplas drogas mediada principalmente por MexA-B OprM. O segundo mecanismo consiste na expressão de metalo- β -lactamases mediadas por plasmídios, capazes de hidrolisar carbapenêmicos de maneira muito eficiente.

O sistema de efluxo Mex AB-OprM, é a principal bomba de efluxo envolvida na resistência bacteriana. A proteína Mex B é uma bomba de efluxo de amplo espectro localizada na membrana plasmática da célula bacteriana; a proteína OprM é uma proteína formadora de poros, que cria um portal de saída através da membrana externa; a proteína Mex A conecta fisicamente esses componentes. Estes mecanismos se expressam após mutações genéticas que ocorrem em sítios conhecidos com nalB, nalC, nfxC, e nfxB.

O mutante nfxC (mexT) ocasionalmente selecionado por fluoroquinolonas, provoca hiperregulação de Mex EF-OprN e reduz OprD com conseqüente resistência a fluoroquinolonas e imipenem e sensibilidade reduzida a meropenem. Logo, a vantagem do imipenem não demonstrar resistência à *P. aeruginosa* é prejudicada pelo fato desta droga prontamente selecionar mutantes resistentes, as quais, provavelmente em nosso estudo não está mutado o gene da proteína OprD, cujo papel principal está na permeabilidade passiva de aminoácidos básicos através da membrana externa,

permitindo também a passagem de carbapenêmicos, embora não de outros β -lactâmicos. Sua perda eleva as CIM(s) de *P. aeruginosa* ao imipenem de 1-2 mg/l, para 8-32 mg/l, provocando assim resistência clínica. Já o meropenem necessita de duas mutações simples para tornar-se resistente: a hiperregulação da bomba de efluxo, mediada pelas proteínas MexAB-OprM, e a perda da porina OprD. (LIVERMORE, D. M., 2001).

No teste de disco-difusão, os isolados clínicos de *P. aeruginosa* apresentaram boa sensibilidade, sendo que a polimixina B e colistin (polimixina E) apresentaram 100% de sensibilidade. O mesmo ocorreu para colistin no teste de diluição em ágar, onde também atingiu 100% de sensibilidade.

A frequência de isolados clínicos de *S. aureus* oxacilina resistentes (MRSA) tem crescido significativamente entre os pacientes com FC, entretanto, foram poucos os centros que reportaram uma frequência maior que 20%. Esses isolados são adquiridos na maioria das vezes enquanto os pacientes estão hospitalizados (MILLER, M. B.; GILLIGAN, P. H., 2003). Neste trabalho, os 6 pacientes que possuíam MRSA que representavam aproximadamente 20% dos isolados de *S. aureus*, já haviam sido hospitalizados. Com relação aos outros antibióticos testados por diluição em ágar, a vancomicina apresentou sensibilidade de 100%, portanto não houve isolados resistentes a este antibiótico nos pacientes com FC estudados, seguida de sulfametoxazol-trimetoprim, oxacilina, gentamicina, ciprofloxacina, eritromicina.

Os resultados sobre uso de antibióticos no tratamento dos pacientes com FC do HC indicam que a sua utilização ocorre mesmo se o paciente não apresentar os sinais e sintomas avaliados nesse estudo, ou seja, que está sendo realizada terapia profilática. Tanto os pacientes exacerbados como os não exacerbados estavam fazendo uso de antibióticos no momento da coleta e os achados de exacerbação não estavam relacionados ao tratamento.

Isso pode ser atribuído ao fato de que o paciente colonizado com algum microrganismo faz tratamento ininterrupto e de forma preventiva para evitar que haja exacerbação. No entanto, este trabalho não apresentou redução significativa da exacerbação com o uso de antibióticos, seja preventivo ou não. Uma explicação possível para isso poderia ser que, no momento da coleta de dados clínicos, o paciente ainda não estivesse utilizando antibiótico por tempo suficiente para ser efetivo ou o paciente teria adquirido uma nova cepa. A análise molecular das amostras irá esclarecer melhor estes achados.

A coloração de Gram avalia a contaminação do escarro por saliva e pela microbiota da orofaringe, verificando a relação entre a quantidade de leucócitos polimorfonucleares e células epiteliais escamosas (NAIR B., 2002). O autor também sugere que a avaliação subjetiva das amostras de escarro dos pacientes com FC, ou seja, a avaliação do aspecto macroscópico da amostra revela-se tão boa quanto a coloração de Gram para identificar se esta é adequada para realização da cultura. Ainda, a avaliação da morfologia bacteriana pode nem sempre estar relacionada com o crescimento das bactérias em técnicas de cultivo.

Por outro lado, em estudo realizado em 1994, Sadeghi afirma que a validade da coloração de Gram em pacientes com suspeita de infecção no trato respiratório inferior tem proporcionado uma triagem efetiva e de baixo custo para avaliação da contaminação da amostra e na determinação da etiologia da infecção, guiando a terapia antibiótica empírica.

Com relação à razão entre a presença de leucócitos e células epiteliais escamosas, utilizando o critério de Katlin e colaboradores, 60% das amostras eram aceitáveis para a cultura, dado pouco abaixo de outro estudo (76,6%) (SADEGHI, E; et al., 1994). As amostras de orofaringe não foram analisadas por esta metodologia, pois geralmente possuem baixa quantidade de polimorfonucleares e grande quantidade de

células epiteliais escamosas, permitindo somente avaliarmos a associação das propriedades morfotintoriais com o resultado da cultura.

Ao analisarmos as propriedades morfotintoriais das bactérias pela coloração de Gram, os resultados da cultura, tanto de escarro como de orofaringe, apresentaram-se positivos em 75,7% no crescimento dos principais patógenos de FC, bem como no achado de outro estudo (RAMSEY, B. M., et al, 1991). Apesar da morfologia bacteriana nem sempre ser específica para o patógeno, houve associação entre a visualização das bactérias e o crescimento na cultura.

Embora não haja evidências de que os dados são comparáveis entre as consultas, pois médicos diferentes prestam atendimento aos pacientes, pela análise geral de sinais e sintomas representados em prontuários, foi possível encontrar dados relevantes de exacerbação pulmonar para que fosse analisada a relação com a cultura quantitativa.

Ao avaliarmos a relação entre a exacerbação pulmonar e a contagem de colônias obtidas nas variáveis relatadas anteriormente, graficamente os dados mostraram uma tendência de associação ao aumento da contagem de colônias nos pacientes exacerbados que foi significativa para *S. aureus*, mas não se confirmou para *P. aeruginosa*.

Não houve diferença significativa entre a presença de microrganismos na cultura semi-quantitativa (amostra pura) e na cultura com diluição. Em alguns casos, quando houve crescimento de *P. aeruginosa* em contagens altas, ocorreu a dificuldade de visualização de colônias isoladas, ou seja, essas colônias podem mascarar o crescimento de outros microrganismos como *H. influenzae*, embora este fato não tenha se mostrado significativo em nosso estudo.

Por isso, realizar pelo menos uma diluição da amostra de escarro, traria o benefício de melhorar a visualização das colônias sem necessidade de fazer eventuais

reisolamentos. Além disso, permite a contagem significativa suficiente para diferenciar os pontos de corte de *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Sugere-se a inclusão de uma placa de BCSA, pois todos os isolados clínicos do complexo *B. cepacia* encontrados nesse estudo foram obtidos a partir deste meio de cultura. Além disso, o uso de placa de ágar manitol salgado favorece e facilita a visualização de *S. aureus*.

Segundo os resultados obtidos de um estudo preliminar e retrospectivo de 70 pacientes com FC atendidos no ambulatório do Hospital de Clínicas, cujos resultados foram apresentados no Congresso Brasileiro de Microbiologia (MATOS, A. P., et al, 2003), a correlação entre a cultura quantitativa e os sintomas clínicos dos pacientes com exacerbação pulmonar foi pequena. Uma das explicações observadas pode ser atribuída ao tratamento em andamento. O paciente, na maioria das vezes, mesmo com sintomas pulmonares, pode estar com baixa contagem de colônias e com uso ininterrupto de antibióticos, o que foi confirmado no presente trabalho.

Esses dados são de grande importância para a avaliação da contagem de colônias e sua correlação entre os sintomas dos pacientes com FC, para o planejamento terapêutico e para o desenvolvimento de estratégias preventivas de tratamento desses pacientes.

7 CONCLUSÕES

1. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a cultura quantitativa pode ser utilizada como parâmetro de avaliação clínica do paciente com fibrose cística. Para fins epidemiológicos sugere-se que a cultura quantitativa seja realizada com uma diluição da amostra após fluidificação. Este procedimento facilita a visualização dos microrganismos presentes em baixas concentrações quando associados a outros em altas concentrações na amostra e é suficiente para demonstrar a contagem de colônias indicativa de exacerbação pulmonar.
2. Com relação aos microrganismos mais isolados, sugere-se a inclusão do meio seletivo para *Burkholderia cepacia* (BCSA), com incubação prolongada de até 5 dias, para todas as culturas de amostras de FC. Este procedimento é importante para obter amostras desta bactéria e permitir uma avaliação mais segura sobre seu papel na exacerbação pulmonar e piora clínica em nosso meio.
3. Sugere-se também a realização de cultura periódica para fungos de todos os pacientes com FC. O baixo número de isolados neste estudo não permitiu estabelecer sua relevância nos pacientes analisados.
4. Os resultados de cultura para micobactérias obtidos no estudo foram inconclusivos. São necessários estudos específicos e direcionados para melhor estabelecer o seu papel nesta população.

5. Houve associação entre a contagem de colônias cultura quantitativa e a exacerbação pulmonar em amostras de *S. aureus*, porém esses resultados não foram significativos para *P. aeruginosa*.

6. Pela da realização da técnica de concentração inibitória mínima (CIM) por diluição em ágar, conclui-se que vários isolados de um mesmo microrganismo possuem perfil idêntico de sensibilidade frente aos antibióticos, sugerindo que as cepas possam ter origem clonal. A evolução da resistência dessas cepas também pode ser observada em alguns casos. Estes dados poderão ser confirmados por técnicas de tipagem molecular.

7. Após a avaliação da coloração de Gram, concluiu-se que há uma boa relação entre as propriedades morfotintoriais das bactérias e o crescimento na cultura. A presença de células do trato respiratório nas amostras avaliadas por essa metodologia não esteve diretamente relacionada à qualidade da amostra.

REFERÊNCIAS

- AKABAS, M. H. Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. **J Biol Chem**, v. 6, n. 375, p. 3729-3732, 2000.
- ALVAREZ, A. E., et al. Fibrose Cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. **J Pediatr**, v. 5, n. 80, p. 371-379, 2004.
- ANDERSEN, D. H. Cystic Fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. **Am J Dis Child**, n. 56, p. 344-399, 1938.
- BAGGENSTOSS, A. H.; POWER, M. H.; GRINDLAY, J. H. Further studies on the pathogenesis of fibrocystic disease of the pancreas. **Arch Pathol**, n. 51, p. 510-517, 1951.
- BALLOWS, S. **Manual of Clinical Microbiology**. 5. ed. Washington, D.C: ASM press, 1991.
- BANGE, F-C.; KIRSCHNER, P.; BÖTTGER E. C. Recovery of Mycobacteria from patients with Cystic Fibrosis. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 11, p. 3761-3763, 1999.
- BAQUERO F.; ALVAREZ, M. E.; CANTÓN, R. Bacteriologic diagnosis of respiratory tract infections. **Clin Microbiol Infect**, v. 2, n. 1, p. 2s10-2s15, 1996.
- BARTH, A. L.; PITT, T. L. Microbial pathogens associated with Cystic Fibrosis: Special focus on *Pseudomonas aeruginosa*. **Braz J Infect Dis**, v. 2, n. 2, p. 43-61, 1998.
- BAUERNFEIND, A., et al. Discrimination of *Burkholderia gladioli* from other *Burkholderia* species detectable in Cystic Fibrosis patients by PCR. **J Clin Microbiol**, v. 9, n. 36, p. 2748-2751, 1998.
- BAXTER, I. A.; LAMBERT, P. A.; SIMPSON, I. N. Isolation from clinical sources of *Burkholderia cepacia* possessing characteristics of *Burkholderia gladioli*. **J Antim Chemoth**, n. 39, p. 169-175, 1997.
- CAMPBELL III, P. W., et al. Detection of *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* using PCR. **Pediatr Pulmonol**, n. 20, p. 40-49, 1995.
- CARVALHO, A. P. D.; et al. Chronic infection of Cystic Fibrosis patient airways by a single clone of *Burkholderia cepacia*: replacement of non-mucoid to mucoid morphotype. **Braz J Microbiol**, v. 1, n. 34, p. 42-44, 2003.
- CHEN, J. S., et al. Endemicity and inter-city spread of *Burkholderia cepacia* genomovar III in cystic fibrosis. **J Pediatr**, n. 139, p. 643-649, 2001.

COENYE, T., et al. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. **J Clin Microbiol**, v. 10, n. 39, p. 3427-3436, 2001.

CUNHA, M. V., et al. Studies on the involvement of the exopolysaccharide produced by Cystic Fibrosis-associated isolates of the *Burkholderia cepacia* complex in biofilm formation and in persistence of respiratory infections. **J Clin Microbiol**, v. 7, n. 42, p. 3052-3058. 2004.

Cystic Fibrosis Trust. Standards for the Clinical Management of Children and Adults with Cystic Fibrosis. New Jersey. 2001.

DASGUPTA, B.; KING, M. Reduction in viscoelasticity in Cystic Fibrosis Sputum in vitro using combined treatment with nacystelyn and rhDNase. **Pediatr Pulmonol**, n. 22, p. 161-166, 1996.

DENTON, M.; TODD, N. J.; LITTLEWOOD, J. M. Role of anti-pseudomonal antibiotics in the emergence of *Stenotrophomonas maltophilia* in Cystic Fibrosis patients. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, n. 15, p. 402-405, 1996.

DISANT'AGNESE, P.A., et al. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas: clinical significance and relationship to the disease. **Pediatr**, n. 12, p. 549-563, 1953.

DÖRING, G., et al. Antibiotic against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. **Eur Respir J**, n. 16, p. 749-767, 2000.

ESPERON, L. C. Triagem neonatal de fibrose cística. **J Pediatr**, v. 2, n. 79, p. 193-194, 2003.

FARIAS, L; ROSÁRIO FILHO, N. A.; KOVALHUK L.; et al. Aspectos clínicos da Fibrose Cística. Experiência no Hospital de Clínicas da UFPR, 1980-1996. **Pediatr**, v. 4, n. 19, p. 241-248. 1997.

FLOTTE, T. R.; LAUBE, B. L. Gene therapy in Cystic Fibrosis. **Chest**, n. 120, p. 124S-131S, 2001.

FREEDMAN, S. D., et al. A membrane lipid imbalance plays a role in the phenotypic expression of cystic fibrosis in cftr (-/-) mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 96, p. 13995-14000, 1999.

GALES, A. C.; REIS, A. O.; JONES, R. N. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing for polymixin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. **J Clin Microbiol**, v. 1, n. 39, p. 183-190, 2001.

GIBSON, L. E.; COOKE, R. E. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. **Pediatr**, n. 23, p. 545-549, 1959.

GILLIGAN, P. H. Microbiology of Airway Disease in Patients with Cystic Fibrosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 1, n. 4, p. 35-51, 1991.

GOVAN, J. R. W. & DERETIC, V. Microbial pathogenesis in Cystic Fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. **Microbiol Rev**, v. 3, n. 60, p. 539-574, 1996.

HENRY D. A, et al. Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with Cystic Fibrosis and use of a simple new selective medium. **J Clin Microbiol**, v. 3, n. 35, p. 614-619, 1997.

HENRY, D. A. et al. Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. **J Clin Microbiol**, v. 3, n. 39, p. 1073-1078.

ISENBERG, H. D. **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. 1 ed. Washington: ASM press, 1992.

ISENBERG, H. D. **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. 2 ed. Washington: ASM press, 2004.

JORGENSEN, J. H.; TURNIDGE, J. D. Susceptibility test methods: Dilution and disk diffusion methods. In: MURRAY, P. R., et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 8 ed. Washington: ASM press. 2003, 1212 p.

JORGENSEN, J. H.; TURNIDGE, J. D. WASHINGTON, J. A. Antibacterial susceptibility tests: Dilution and disk diffusion methods. In: MURRAY, P. R., et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 8 ed. Washington: ASM press, 2003, 1212 p.

KAHL, B. C. et al. Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of Cystic Fibrosis patients during a 6-year prospective study. **J Clin Microbiol**, v. 9, n. 41, p. 4424-4427, 2003.

KILIAN, M. *Haemophilus*. In: MURRAY, P. R., et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington: ASM press, 2003. 1212 p.

KISKA, D. L.; GILLIGAN, P. H. *Pseudomonas*. In: MURRAY, P. R., et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington: ASM press, 2003. 1212 p.

KONEMAN, Elmer K. et al. **Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology**. 5. ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1997.

KROLL, C. M.; TERRA, J. P. Bactérias isoladas em cultura de escarro e secreção de orofaringe de indivíduos portadores de Fibrose Cística. **Laes Haes**, p. 98-118, 1999.

LEMONS, A. C. M., et al. Fibrose Cística em adultos: aspectos clínicos e espirométricos. **J Bras Pneumol**, v. 1, n. 30, p. 9-13, 2004.

LIVERMORE, D. M. Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems. **J Antimicrob Chemother**, v. 3, n. 47, p. 247-250, 2001.

LIVERMORE, D. M. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? **Clin Inf Dis**, n. 34: 634-640. 2002.

LYCZAK, J. B.; CANNON. C. L.; PIER, G. B. Lung infections associated with Cystic Fibrosis. **Clin Microbiol Rev**, n. 2, v. 15, p. 194-222, 2002.

MANNO, G.; et al. Epidemiology and clinical course of *Burkholderia cepacia* complex infections, particularly those caused by different *Burkholderia cenocepacia* strains, among patients attending Italian Cystic Fibrosis center. **J Clin Microbiol**, v. 4, n. 42, p. 1491-1497, 2004.

MARSHALL, B. C. Patient registry annual data report. Bethesda: Cystic Fibrosis Foundation. 2003.

MARTIN, C.; ICHOU, M. A.; MASSICOT, P.; et al. Genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with Cystic Fibrosis revealed by restriction fragment length polymorphism of the rRNA gene region. **J Clin Microbiol**, v. 6, n. 33, p. 1461-1466, 1995.

MATOS, A. P., et al. Análise Preliminar da Cultura Quantitativa de Amostras de Pacientes com Fibrose Cística e Prevalência de Patógenos. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 22, Florianópolis. **Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia. 2003.

MILLER, M. B.; GILLIGAN, P. H. Laboratory Aspects of Management of Chronic Pulmonary Infections in Patients with Cystic Fibrosis. **J Clin Microbiol**, v. 9, n. 41, p. 4009-4015, 2003.

MIMS, C., et al. **Microbiologia Médica**. 1. ed. London: UK, 1995.

MURRAY, P. R., et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington: ASM press, 2003.

NAIR, B.; STAPP J., et al. Utility of Gram Staining for Evaluation of the Quality of Cystic Fibrosis Sputum Samples. **J Clin Microbiol**, v. 8, n. 40, p. 2791-2794, 2002.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard**. 5. ed. Pennsylvania: NCCLS, 2000.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard**. 9. ed. Pennsylvania: NCCLS, 2004.

ORENSTEIN, D. M. **Cystic Fibrosis**: a guide for patient and family. 2. ed. Philadelphia: Lippincott. 1996, 462 p.

RAMSEY, B. M., et al. Predictive value of oropharyngeal cultures for identifying lower airway bacteria in Cystic Fibrosis Patients. **Am Rev Respir Dis**, n. 144, p. 331-337, 1991.

RASKIN, S. **Estudo multicêntrico das bases da genética molecular e da epidemiologia da fibrose cística em populações brasileiras**. Curitiba, 2001. Tese. Universidade Federal do Paraná.

RIBEIRO, J. D.; RIBEIRO, M. A.; RIBEIRO, A. F. Controvérsias na fibrose cística– do pediatra ao especialista. **J Pediatr**, v. 2, n. 78, p. 171-186, 2002.

RIBEIRO, J. D.; RIBEIRO, M. A.; RIBEIRO, A. F. Resposta dos autores à triagem neonatal de fibrose cística. **J Pediatr**, v. 2, n. 79, p. 193-194, 2003.

RIEDI, C. A.; ZAVADNIAK, A. L.; SILVA, D. C.; FRANCO, A.; ROSÁRIO FILHO, N. A. Comparação da condutividade com a determinação de sódio na mesma amostra de suor. **J Pediatr**, v. 6, n. 76, p. 443-446, 2000.

ROBINSON, P., et al. *Pseudomonas* cross-infection from Cystic Fibrosis patients to non-Cystic Fibrosis patients. Implications for inpatient care of respiratory patients. **J of Clin Microbiol**, v. 12, n. 41, p. 5741, 2003.

ROMÁN, F.; et al. Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in Cystic Fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. **J Clin Microbiol**, v. 1, n. 42, p. 1450-1459, 2004.

ROZOV, T. **Doenças pulmonares em pediatria**: diagnóstico e tratamento. 1. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1999.

RUOFF, K. L.; WHILEY, R. A.; BEIGHTON. *Streptococcus*. In: MURRAY, P. R., et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington: ASM press, 2003. 1212 p.

SADEGHI, E; MATLOW, A., et al. Utility of Gram Stain of Sputa from Patients with Cystic Fibrosis. **J Clin Microbiol**, v. 1, n. 32, p. 54-58, 1994.

SAIMAN, L.; SIEGEL, J. Infection Control in Cystic Fibrosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 1, n. 17, p. 57-71, 2004.

SANTANA, M. A., et al. Prevalence of Pathogens in Cystic Fibrosis Patients in Bahia, Brazil. **Braz J Infec Dis**, n. 7, p. 69-72, 2003.

SANTOS, G. P. C., et al. Programa de triagem neonatal para Fibrose Cística no estado do Paraná: avaliação após 30 meses de sua implantação. **J Pediatr**, v. 3, n. 81, p. 240-244, 2005.

SEGONDS, C.; PAUTE, S.; CHABANON, G. Use of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Ralstonia* and *Pandoraea* species: interest in determination of the respiratory bacterial flora in patients with Cystic Fibrosis. **J Clin Microbiol**, v. 7, n. 41, p. 3415-3418, 2003.

SHELLY, D. B., et al. Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* Complex from Cystic Fibrosis sputum culture. **J Clin Microbiol**, v. 8, n. 38, p. 3112-3115, 2000.

SILBERT, S.; BARTH, A. L., SADER, H. S. Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* in Brazilian Cystic Fibrosis patients. **J Clin Microbiol**, v. 11, n. 39, p. 3976-3981, 2001.

SMITH, D. L., et al. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and the use of strain genotyping. **J Hospit Infect**, n. 26, p. 325-331, 1993.

SOUZA, H. A. P. H. M. **Estudo da evolução da colonização bacteriana na Fibrose Cística com ênfase em *Staphylococcus aureus***. Curitiba, 2005. Dissertação. (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

TAUSSIG, L. M.; LANDAU, L. I. **Pediatric respiratory medicine**. Saint Louis: Mosby, 1998.

TAYLOR, R. F. H., et al. *Pseudomonas cepacia* pulmonary infection in adults with cystic fibrosis: is nosocomial acquisition occurring? **J Hospit Infect**, n. 21, p. 199-204, 1992.

TENOVER, F. C., et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v. 9, n. 33, p. 2233-2239, 1995.

THOMASSEN, M. J., et al. Cultures of thoracotomy specimens confirm usefulness of sputum cultures in cystic fibrosis. **J Pediatr**, v. 3, n. 104, p. 352-356, 1984.

TSORAEVA, A.; MARTÍNEZ, C. R. Comparison of two culture media selective isolation and membrane filter enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in water. **Rev Latinoam Microbiol**, n. 42, p. 149-154, 2000.

TSUI, L. C. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. **Am J Respir Crit Care Med**, n. 151, p. 47-53, 1995.

WHITTIER, S., et al. Proficiency testing of clinical microbiology laboratories using modified decontamination procedures for detection of nontuberculous Mycobacteria in sputum samples from Cystic Fibrosis patients. **J Clin Microbiol**, v. 10, n. 35, p. 2706-2706. 1997.

WONG, K.; ROBERTS, M. C.; OWENS, L., et al. Selective media for the quantitation of bacteria in Cystic Fibrosis sputum. **J Med Microbiol**, n. 17, p. 113-119. 1984.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - CONTAGEM DE COLÔNIAS E EXACERBAÇÃO PULMONAR DE 31 PACIENTES COM CULTURA QUANTITATIVA.....	101
APÊNDICE 2 -FÓRMULAS DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS.....	105
APÊNDICE 3 -REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DA CIM POR DILUIÇÃO EM ÁGAR.....	108

APÊNDICE 1 - CONTAGEM DE COLÔNIAS E EXACERBAÇÃO PULMONAR DE 31 PACIENTES COM CULTURA QUANTITATIVA

PACIENTE	COLETA	BACTÉRIA	UFC/ml	EXACERB.
1	1	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	NÃO
1	1	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	NÃO
1	2	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^6$	NÃO
1	3	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	SIM
1	4	<i>S. aureus</i>	$> 10^7$	NÃO
1	4	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	NÃO
1	4	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^6$	NÃO
2	1	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	NÃO
2	2	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	NÃO
2	3	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	NÃO
2	4	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	NÃO
2	4	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^4$	NÃO
3	1	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	NÃO
3	2	<i>S. aureus</i>	$> 10^7$	NÃO
3	3	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	NÃO
3	3	<i>S. maltophilia</i>	$> 10^5$	NÃO
3	4	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	NÃO
4	1	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	SIM
4	1	<i>H. influenzae</i>	$> 10^7$	SIM
4	2	<i>S. aureus</i>	$> 10^5$	NÃO
4	2	<i>H. influenzae</i>	$> 10^6$	NÃO
4	3	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	NÃO
4	3	<i>H. influenzae</i>	$> 10^6$	NÃO
10	1	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^6$	NÃO
10	1	<i>S. aureus</i>	$> 10^4$	NÃO
10	2	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	SIM
10	3	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	SIM
10	3	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	SIM
10	4	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^6$	NÃO
10	4	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^6$	NÃO
12	1	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	NÃO
12	1	<i>H. influenzae</i>	$> 10^6$	NÃO
12	2	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	SIM
12	3	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	NÃO
13	1	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	NÃO
13	1	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^8$	NÃO
13	2	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^8$	NÃO
13	2	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^8$	NÃO
13	3	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	SIM
13	3	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	SIM
13	4	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	NÃO
13	4	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	NÃO

PACIENTE	COLETA	BACTÉRIA	UFC/ml	EXACERB.
15	1	<i>S. aureus</i>	$> 10^3$	NÃO
15	1	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	NÃO
15	1	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	NÃO
15	2	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	NÃO
15	2	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	NÃO
15	2	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	NÃO
15	3	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^6$	SIM
15	3	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^6$	SIM
15	3	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	SIM
15	4	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	SIM
15	4	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^6$	SIM
16	1	<i>S. aureus</i>	$> 10^7$	SIM
16	2	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	NÃO
16	2	<i>S. marcescens</i>	$> 10^6$	NÃO
16	3	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^3$	NÃO
16	3	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^3$	NÃO
17	4	SDBP		NÃO
18	1	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	NÃO
18	1	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^6$	NÃO
18	2	<i>S. aureus</i>	$> 10^4$	NÃO
18	2	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	NÃO
18	3	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^6$	NÃO
18	4	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	NÃO
18	4	<i>S. aureus</i>	$> 10^5$	NÃO
19	1	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^8$	NÃO
19	2	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^8$	NÃO
19	3	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^6$	NÃO
19	4	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	NÃO
19	4	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^6$	NÃO
20	2	<i>S. aureus</i>	$> 10^3$	NÃO
20	3	Comp. <i>B. cepacia</i>	$> 10^6$	NÃO
20	4	<i>S. aureus</i>	$> 10^8$	SIM
20	4	Comp. <i>B. cepacia</i>	$> 10^6$	SIM
20	4	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^4$	SIM
21	1	<i>S. aureus</i>	$> 10^7$	NÃO
21	2	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	SIM
21	2	<i>H. influenzae</i>	$> 10^8$	SIM
21	3	<i>S. aureus</i>	$> 10^7$	SIM
21	3	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^5$	SIM
21	4	<i>S. aureus</i>	$> 10^8$	SIM
21	4	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^6$	SIM
22	1	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	NÃO
22	2	SDBP		NÃO
22	3	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	SIM
22	4	<i>H. influenzae</i>	$> 10^6$	SIM

PACIENTE	COLETA	BACTÉRIA	UFC/ml	EXACERB.
23	1	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	SIM
23	1	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	SIM
23	1	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	SIM
23	1	Comp. <i>B. cepacia</i>	$> 10^5$	SIM
23	2	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	SIM
23	2	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^6$	SIM
23	2	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	SIM
23	3	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	SIM
23	3	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	SIM
23	3	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	SIM
23	3	Comp. <i>B. cepacia</i>	$> 10^4$	SIM
23	4	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	NÃO
23	4	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	NÃO
23	4	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	NÃO
23	4	Comp. <i>B. cepacia</i>	$> 10^5$	NÃO
24	1	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	NÃO
24	2	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^6$	NÃO
24	3	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	NÃO
24	4	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^3$	NÃO
25	1	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^6$	NÃO
25	1	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	NÃO
25	2	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	NÃO
25	2	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	NÃO
26	1	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	NÃO
26	1	Comp. <i>B. cepacia</i>	$> 10^3$	NÃO
26	2	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	NÃO
26	3	SDBP		NÃO
26	4	<i>S. aureus</i>	$> 10^5$	NÃO
26	4	<i>A. baumannii</i>	$> 10^3$	NÃO
27	1	<i>S. aureus</i>	$> 10^7$	SIM
27	1	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^3$	SIM
27	2	<i>S. aureus</i>	$> 10^7$	SIM
27	2	<i>H. influenzae</i>	$> 10^7$	SIM
27	3	<i>S. aureus</i>	$> 10^3$	NÃO
27	4	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	NÃO
28	3	<i>S. aureus</i>	$> 10^3$	NÃO
28	4	<i>S. aureus</i>	$> 10^3$	NÃO
29	2	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	NÃO
29	3	SDBP		NÃO
29	2	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^6$	NÃO
29	2	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^6$	NÃO
30	1	SDBP		NÃO
30	2	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	NÃO
30	2	<i>H. influenzae</i>	$> 10^5$	NÃO
30	2	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^3$	NÃO

PACIENTE	COLETA	BACTÉRIA	UFC/ml	EXACERB.
30	3	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^5$	NÃO
30	3	<i>S. aureus</i>	$> 10^5$	NÃO
30	4	<i>S. aureus</i>	$> 10^7$	NÃO
31	1	<i>S. aureus</i>	$> 10^7$	NÃO
31	3	SDBP		NÃO
31	4	SDBP		NÃO
32	1	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	NÃO
32	1	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^6$	NÃO
32	2	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	SIM
32	2	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^6$	SIM
32	3	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	NÃO
32	3	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^6$	NÃO
34	3	<i>H. influenzae</i>	$> 10^3$	NÃO
34	4	<i>S. aureus</i>	$> 10^3$	NÃO
35	3	<i>S. aureus</i>	$> 10^3$	NÃO
35	4	SDBP		NÃO
36	1	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	NÃO
36	2	<i>S. aureus</i>	$> 10^3$	NÃO
37	2	<i>S. maltophilia</i>	$> 10^3$	NÃO
37	3	<i>S. aureus</i>	$> 10^3$	NÃO
38	1	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^5$	NÃO
38	1	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^6$	NÃO
38	1	<i>S. aureus</i>	$> 10^4$	NÃO
38	1	Comp. <i>B. cepacia</i>	$> 10^5$	NÃO
38	2	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	NÃO
38	2	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^6$	NÃO
38	2	Comp. <i>B. cepacia</i>	$> 10^6$	NÃO
43	1	<i>S. aureus</i>	$> 10^6$	SIM
43	1	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	SIM
43	1	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	SIM
43	2	<i>P. aeruginosa</i> m	$> 10^7$	SIM
43	2	<i>P. aeruginosa</i>	$> 10^7$	SIM

LEGENDA: UFC – unidades formadoras de colônias; EXACERB – exacerbação pulmonar; SDBP – sem desenvolvimento de bactérias patogênicas; m – cepa mucóide.

APÊNDICE 2 - FÓRMULAS DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

1. Ágar Chocolate

COMPONENTE	QUANTIDADE
Ágar Mueller-Hinton (DIFCO®)	38 g
Sangue de Carneiro desfibrinado (NEWPROV®)	50 ml
Suplemento VX (NEWPROV®)	Segundo instruções do fabricante
Água destilada	1000 ml

2. Ágar Sangue de Carneiro 5%

COMPONENTE	QUANTIDADE
Ágar Columbia (OXOID®)	38 g
Sangue de Carneiro desfibrinado (NEWPROV®)	50 ml
Água destilada	1000 ml

3. Ágar Mac Conkey

COMPONENTE	QUANTIDADE
Ágar Mac Conkey (OXOID®)	38 g
Água destilada	1000 ml

4. Ágar Manitol Salgado (MSA)

COMPONENTE	QUANTIDADE
Extrato de carne	1 g
Peptona ou polipeptona (BBL [®])	10 g
NaCl	75 g
Manitol	10 g
Ágar	15 g
Vermelho de fenol	10 ml (sol. 0,25% em água)
Água destilada	1000 ml

5. Ágar Seletivo para *B. cepacia* (BCSA)

COMPONENTE	QUANTIDADE
NaCl	5 g
Sacarose	10 g
Lactose	10 g
Vermelho de fenol	10 ml (sol 0,8% em água)
Cristal violeta	10 ml (sol. 0,02% em água)
Peptona tripticaseína	10 g
Extrato de leveduras	1,5 g
Ágar	14 g
Água destilada	1000 ml

6. Ágar Mueller-Hinton

COMPONENTE	QUANTIDADE
Ágar Mueller-Hinton (DIFCO®)	38 g
Água destilada	1000 ml

APÊNDICE 3 - REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DA CIM POR DILUIÇÃO EM ÁGAR

Produto	Marca	Lote	Apresentação
Ágar Mueller-Hinton	Difco	4194818	
Amicacina	Sigma	014K1282	Sal sulfato
Cefepime	Bristol Myers Squibb	04G100	Medicamento, cloridrato
Ceftazidima	ABL	100973 C	Medicamento
Colistina (polimixina E)	Sigma	123K1382	Sal sulfato 20,227 un/mg
Eritromicina	Sigma	072K17636	Pureza 98%
Gentamicina	Sigma	030K03251	Sal sulfato
Imipenem	Merck	FI019	Medicamento
Meropenem	Astra Zeneca	1B04B02	Medicamento
Oxacilina	Sigma	113K0523	Sal sódico monohidratado
Sulfametoxazol	Sigma	103K1267	Sal
Tobramicina	Sigma	083K0523	Sal sulfato
Trimetoprim	Sigma	60H0551	Sal
Vancomicina	Sigma	31K1738	Sal

ANEXO - TERMO APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA EM SÉRES HUMANOS DO HC-UFPR

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.